

**Aus der Medizinischen Poliklinik ó Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Funktion des Interferon-regulierenden Faktors 4 in
intrarenalen Antigen-präsentierenden Zellen
beim akuten Nierenversagen.**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Saraswati Linda Lassen
Anjuna/Indien
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Vigo Heissmeyer

Priv. Doz. Dr. Wolfgang Neuhofer

Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Priv. Doc. Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech.....

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR.....

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1 Akute Nierenschädigung	2
1.1.1 Epidemiologie der akuten Nierenschädigung	2
1.1.2 Pathophysiologie der akuten Nierenschädigung	4
1.2 Das Immunsystem	10
1.2.1 Das angeborene Immunsystem	10
1.2.2 Das adaptive Immunsystem	16
1.2.3 Immunreaktionen durch Ischämie-Reperfusion in der Niere	17
1.2.4 Regulationsmechanismen von Immunreaktionen	23
1.2.5 Interferon-regulierende Faktoren	25
1.3 Ziel der Untersuchung und Hypothese	32
2. Material und Methoden	34
2.1 Tierzucht und Tierhaltung	36
2.2 Genotypisierung der Mäuse	36
2.3 Uni- und bilaterale Abklemmung der Nierengefäße	38
2.4 Behandlung der Mäuse vor der Nierengefäßabklemmung	42
2.5 Blutentnahme und Kreatinin- und Harnstoffmessung im Serum	44
2.6 RNA-Gewinnung und Umschreiben in cDNA	45
2.6.1 RNA-Isolation aus Nierengewebe	45
2.6.2 Umschreibung der mRNA in cDNA	47
2.7 Real-Time qPCR (LightCycler 480)	48
2.8 Periodic Acid Schiff-(PAS)-Färbung	52
2.9 Immunhistochemie: Neutrophile, Makrophagen und T-Zellen	54
2.10 Western Blot	56
2.11 Isolation von Zellpopulationen aus Nieren und Milz	63
2.11.1 Isolation von Monozyten aus der Milz	63
2.11.2 Isolation von Tubulusepithelzellen	63
2.11.3 Isolation von Zellpopulationen durch MicroBeads im Magnetfeld	65
2.12 Stimulation von Zellen mit Sauerstoffradikalen	66
2.13 Statistische Auswertung	67

3.	Ergebnisse	70
3.1	IRF4-mRNA-Basisexpression verschiedener Organe der C57BL/6-Maus.....	70
3.2	Zytokin-Basisexpression in IRF4+/+ und IRF4/- Mäusen	71
3.3	IRF4-Induktion durch Sauerstoffradikale	72
3.4	IRF4- und IRF5-Expression nach Ischämie-Reperfusion in der Niere	73
3.4.1	IRF4- und IRF5-mRNA-Level in der Niere nach renaler IR.....	73
3.4.2	Untersuchung der IRF4-Proteine in der Niere nach renaler IR.....	74
3.4	IRF4 wird in CD45/CD11c-doppelpositiven Zellen exprimiert	75
3.5	Antioxidantien heben IR-induzierte IRF4-Expression auf	75
3.6	IRF4/- verstärkt das Ausmaß des akuten Nierenversagens.....	76
3.7	IRF4/- verstärkt den Tubulusschaden nach Ischämie-Reperfusion.....	77
3.8	IRF4/- verstärkt die Entzündungsreaktion nach Ischämie-Reperfusion	79
3.8.1	IRF4/- geht mit erhöhter Zytokin/Chemokin-Expression einher	79
3.8.2	IRF4/- geht mit erhöhter Neutrophilen-Rekrutierung einher.....	81
3.9.1	Renale Makrophagen- und T-Zell-Rekrutierung	82
3.10	Clodronat reduziert die Entzündung und das ANV in IRF4/- Mäusen	83
3.11	Etanercept reduziert die Entzündung und das ANV in IRF4/- Mäusen	85
4.	Diskussion.....	88
5.	Zusammenfassung.....	102
	Abkürzungsverzeichnis.....	114
	Danksagung.....	119

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2009 bis Dezember 2010 in den Forschungslabors der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Rechtliche Grundlage der Tierversuche

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden.

Förderung des Projektes

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin“ durch das Förderprogramm „Förderung von Forschung und Lehre“ (*FöFoLe*) der Ludwig-Maximilians-Universität München gefördert.

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen / Präsentationen hervor:

- Lassen S, Lech M, Römmele Ch, Mittrücker HW, Mak TW, Anders HJ:
Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure.
J. Immunol.; 185: 1976-83; Jul. 2010
- Posterpräsentation, TSIS München, 2010
- Young Investigator Award, DGIM Wiesbaden, 2010
- *Fellows night* / Nephrologisches Forum München, 2010

Kapitel 1:

Einleitung

1. Einleitung

1.1 Akute Nierenschädigung

1.1.1 Epidemiologie der akuten Nierenschädigung

Der Begriff šakutes Nierenversagenš wurde von der internationalen Organisation šAcute Kidney Injury Networkš (AKIN) durch den Begriff šakute Nierenschädigungš ersetzt, um dem breiten Spektrum des Krankheitsbildes und seinen Folgen gerecht zu werden. Der traditionelle Begriff šakutes Nierenversagenš fokussierte zu stark auf die Nierenfunktion und beschränkt sich heute auf den *kompletten* Verlust der Nierenfunktion. Die neue Terminologie schließt neben funktionelle auch morphologische Veränderungen der Niere ein und bezieht sich auch auf moderate Verschlechterungen der Nierenfunktion (1). Diese Veränderung wurde nötig, da es zunehmend Hinweise darauf gibt, dass bereits kleine Veränderungen der Nierenfunktion zur erheblichen Verschlechterung des Gesamtüberlebens führen können (2, 3). Im Jahr 2002 stellte die šAcute Dialysis Quality Initiativeš (ADQI)-Gruppe die RIFLE-Kriterien (*Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage renal disease*) auf, anhand dessen die akute Nierenschädigung nach dem relativen bzw. absoluten Anstieg des Kreatininwerts im Serum, der Menge der Urinausscheidung und dem Zeitverlauf definiert wird (Tabelle 1). Nach der neueren AKIN-Definition muss die Reduktion der Nierenfunktion innerhalb von 48 Stunden auftreten (1). In der Regel entsteht die akute Nierenschädigung im Krankenhaus, selten wird sie auch ambulant erworben. 2-7% aller hospitalisierten Patienten und 30% aller Patienten auf Intensivstationen entwickeln eine akute Nierenschädigung (4). Dadurch wird deutlich, dass Patienten mit schweren Grund- und Begleiterkrankungen das höchste Risiko tragen, eine akute Nierenschädigung zu entwickeln.

Es zeichnete sich ein Anstieg der Inzidenz der akuten Nierenschädigung bei hospitalisierten Patienten von 1,5% auf 3,6% im Zeitraum von 1992 bis 2001 in Industrieländer ab. Allerdings gibt es Hinweise, dass diese Daten die wirkliche Inzidenzentwicklung unterschätzen (1). Ursächlich für die Inzidenzzunahme ist die schnell wachsende Population der über 60-jährigen, die aufgrund altersbedingter Veränderung in der Niere, Erkrankungen und häufigere Medikamenteneinnahmen ein höheres Risiko für die Entwicklung einer akuten Nierenschädigung tragen. Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenzrate von 1,9% bei den unter 60-jährigen kontinuierlich auf 2,6% bei den über 85-jährigen an. Zudem gibt es Hinweise, dass das mittlere Erkrankungsalter der akuten Nierenschädigung ansteigt, was ebenfalls die höhere Lebenserwartung der Population reflektiert (1).

Tabelle 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung nach RIFLE und AKIN (1)

Stadien	Kreatininveränderungen im Serum	Urinausscheidung
RIFLE-Kriterien		
erhöhtes Risiko	Anstieg S-Kreatinin: 1,5-2-fach des Ausgangswertes	<0,5ml/kg/h x 6 h
Nierenschädigung	Anstieg S-Kreatinin: 2-3-fach des Ausgangswertes	<0,5ml/kg/h x 12 h
Nierenfunktionsverlust	Anstieg S-Kreatinin: >3-fach des Ausgangswertes oder Kreatininwert >4mg/dl mit akutem Anstieg von >0,5mg/dl	<0,5ml/kg/h x 24 h od. Anurie x 12h
kompletter N-Funktionsverlust	Persistierendes ANV von > 4 Wochen	
Endstadium Nierenerkrankung	Persistierendes ANV von > 3 Monate	
AKIN-Kriterien		
1	Anstieg S-Kreatinin: 1,5-2-fach des Ausgangswertes oder Kreatininanstieg von >0,3mg/dl	<0,5ml/kg/h x 6h
2	Anstieg S-Kreatinin: 2-3-fach des Ausgangswertes	<0,5ml/kg/h x 12h
3	Anstieg S-Kreatinin: >3-fach des Ausgangswertes oder Kreatininwert >4mg/dl mit akutem Anstieg von >0,5mg/dl	<0,5ml/kg/h x 24h od. Anurie x 12h

Trotz erheblicher Fortschritte in der medizinischen Entwicklung hat sich die Mortalität und Morbidität für extrarenale Komplikationen der akuten Nierenschädigung in den letzten drei Jahrzehnten kaum verändert. Je nach Grunderkrankung variiert sie zwischen 20 und 50% (4). Zudem konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die akute Nierenschädigung nicht nur einen Indikator für die Schwere der Grunderkrankung darstellt, sondern ein eigenständiger Risikofaktor für Mortalität und Morbidität ist. Die Entwicklung eines ANV erhöht das Mortalitätsrisiko z.B. nach thorakoabdominalen Aortenoperationen (5), im Verlauf einer Sepsis (6) oder nach einer Amphotericin-B-Therapie (7). Intensive Nierenersatz-Therapie reduziert die Mortalität nicht ausreichend (6). Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der akuten Nierenschädigung und der inflammatorischen Prozesse, könnte in der Zukunft zu neuen therapeutischen Möglichkeiten verhelfen.

Wenn der Patient die akute Nierenschädigung überlebt, regeneriert sich die Niere teilweise, so dass nur 10 bis 20% der Patienten eine dialysepflichtige Nierenschädigung behalten. Dabei liefern Kreatinin- und Harnstoffwerte im Serum allerdings keine ausreichende Auskunft über bleibende Langzeitschäden (4).

1.1.2. Pathophysiologie der akuten Nierenschädigung

Die klassische Einteilung unterscheidet zwischen prärenale (55%), intrarenale (40%) und postrenale (5%) Ursachen, wobei die Übergänge fließend sind (4). Meist lässt sich keine einzelne Ursache identifizieren, wenn mehrere Noxen gleichzeitig wirken. Desweiteren müssen primär renoparenchymale von sekundären, meist systemischen Erkrankungen bei primär gesunden Nieren unterschieden werden.

Prärenales Nierenversagen

Am häufigsten sind die prärenalen Ursachen (55%), die mit einer renalen Minderperfusion einhergehen. Definitionsgemäß entsteht bei der prärenalen akuten Nierenschädigung kein Parenchymschaden der Nieren und ist bei Wiederherstellung eines ausreichenden Blutflusses reversibel. Zwei Mechanismen können zur renalen Perfusionsminderung beitragen: eine systemische Hypovolämie und eine gestörte renale Hämodynamik. Ersteres kann nach ausgedehnten inneren und äußeren Blutungen z.B. nach Verkehrsunfällen entstehen. Starker Flüssigkeitsverlust durch Erbrechen und Durchfall oder vermehrte renale Ausscheidung z.B. im Rahmen eines Diabetes mellitus, eines Diabetes insipidus oder durch Diuretikagabe können ebenfalls das Blutvolumen reduzieren. Trotz ausreichenden Blutvolumens kann die renale Hämodynamik durch systemische Vasodilatation aufgrund einer Sepsis, eines anaphylaktischen Schocks oder medikamenteninduziert beeinträchtigt werden. Zudem können sowohl kardiovaskuläre Erkrankungen, die mit einem verminderten Herzzeitvolumen einhergehen als auch das hepatorenale Syndrom eine renalen Minderperfusion bedingen. Das hepatorenale Syndrom entsteht durch akutes Leberversagen oder einer fortgeschrittenen Leberzirrhose mit portaler Hypertension. Das aufgestaute Blut dilatiert die Arterien im Splanchnikusgebiet gefolgt von Aszitesbildung und einem resultierenden intravasalen Flüssigkeitsmangel. Gegenregulatorisch zum niedrigen Blutdruck kommt es zur ausgeprägten afferenten Renovasokonstriktion mit Versagen der Nierenfunktion (4, 8). Der Übergang zur intrarenalen Schädigung ist fließend. Bleibt die Hypoperfusion der Nieren zu lange bestehen, kommt es zur ischämiebedingten Tubulusnekrose.

Intrarenales Nierenversagen

Intrarenal kann jedes Kompartiment Ursache für eine akute Nierenschädigung sein: das makrovaskuläre Gefäßsystem, das mikrovaskuläre Gefäßsystem mit den Glomeruli, das Interstitium und das Tubulussystem. Im arteriellen Schenkel der großen Gefäße führen arteriosklerotische Plaques, Thrombosen, Embolien, Aneurysmen und Vaskulitiden zu Gefäßverengungen bzw. -verschlüssen. Die Venen sind seltener betroffen. Sie werden durch Thrombosen verengt oder durch Tumoren von außen komprimiert. Um eine akute Nierenschädigung auszulösen, muss die Obstruktion beidseits bzw. einseitig bei einer Einzelniere vorhanden sein, da eine Niere ausreicht, um den Funktionsverlust auszugleichen. Dies kann zu anhaltender Ischämie der Niere mit Gewebeschäden führen. Auch im mikrovaskulären System können thrombembolische Ereignisse die Nierenfunktion verschlechtern. Desweiteren prädisponieren Glomerulonephritiden, Vaskulitiden und Kollagenosen wie der systemische Lupus erythematodes zum Nierenversagen. Das Interstitium wird v.a. durch Medikamente, wie z.B. nicht-steroidale Antirheumatika oder einige Antibiotika und durch Infektionen beeinträchtigt (4).

Postrenales Nierenversagen

Das postrenal verursachte Nierenversagen ist mit 5% insgesamt ein seltenes Ereignis. Mit zunehmendem Alter nimmt die Häufigkeit allerdings aufgrund von Pathologien v.a. der Prostata zu. Die Schädigung der primär gesunden Nieren beginnt mit der Obstruktion der ableitenden Harnwege. Dabei kann der Urin nicht mehr abfließen und der intraluminale Druck steigt an. Bei längerem Bestehen führt dies zur Erweiterung der Ureteren, der Nierenbecken und der Nierenkelche. Der zunehmende Gegendruck zum Filtrationsdruck lässt schließlich die GFR sinken. Auch im Fall der postrenal verursachten Nierenschädigung reicht eine Niere aus, um eine ausreichende Ausscheidungsfunktion zu erfüllen. Deshalb ist ein bilateraler Verschluss der ableitenden Harnwege proximal der Blase bzw. unilateral im Falle einer Einzelniere notwendig. Dies tritt allerdings selten auf. Sehr viel häufiger ist die Obstruktion zwischen äußerem Urethrasphinkter und Blasen Hals. Dabei nehmen Prostatapathologien die führende Stellung ein. Am häufigsten ist die benigne Prostatahyperplasie, gefolgt von Infektionen und dem Prostatakarzinom. Neurogene Blasenentleerungsstörungen, Therapie mit Anticholinergika und Urethritis können einen Spasmus des Blasen Hals verursachen. Wie bei den vorher beschriebenen ätiologischen Gruppen, prädisponieren auch hier chronische Nierenerkrankungen zum ANV (4).

Die ischämische Nierenschädigung

Die ischämiebedingte Schädigung entsteht aus einer langanhaltenden renalen Hypoperfusion meist prärenalen Ursprungs, am häufigsten nach großen Operationen am Herzen, schweren Traumen, Sepsis, schwerem Blut- oder Volumenverlust. Weitere Risikofaktoren sind vorbestehende chronische Nierenerkrankungen und Exposition zu Nephrotoxinen, die im nächsten Abschnitt besprochen werden. Langanhaltende Ischämie kann ausgeprägte kortikale Nekrosen mit irreversiblen Nierenversagen zur Folge haben. Dabei sind die S3-Segmente der proximalen Tubuli und die medullären Anteile der dicken aufsteigenden Henle-Schleife am stärksten vom Sauerstoffmangel betroffen, da in diesen Abschnitten die höchste Aktivität der ATP-abhängigen Transsportvorgänge stattfindet (Abbildung 1). Ausgeprägte ischämisch- (und toxisch-) bedingte Schäden am Tubulussystem werden als akute Tubulusnekrose bezeichnet. (4)

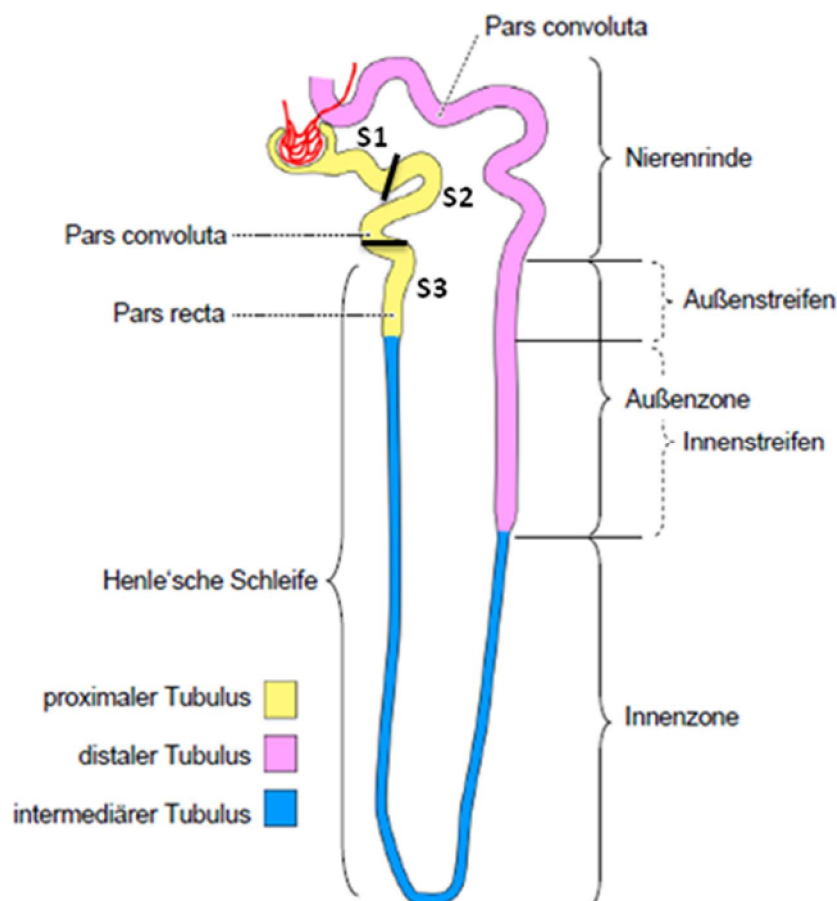


Abbildung 1: Aufbau eines juxtamedullären Nephrons [<http://genomebiology.com/2008/9/5/R84/figure/F2>]. Der stärkste Sauerstoffverbrauch findet im S3-Segment des proximalen Tubulus und im medullären Teil der dicken aufsteigenden Henle-Schleife statt. Ischämiebedingte Tubulusschäden betreffen deshalb hauptsächlich diese Abschnitte (4).

Pathophysiologisch lassen sich vier Phasen abgrenzen: Initiation, Extension, Stabilisierung und Regeneration. Die Initiation kann Tage bis Wochen andauern und ist gekennzeichnet durch den Abfall der glomerulären Filtrationsrate, da der Blutdruck durch die Hypovolämie zu niedrig ist, um ausreichend Ultrafiltrat abzapressen. Nekrotische Tubuluszellen lösen sich von der Basalmembran ab und behindern den Urinfluss in den Tubuli und erhöhen den intratubulären Druck. Durch das zunehmend zerstörte Tubulusepithel sickert Flüssigkeit ins Interstitium (Ödem). Durch die zelluläre Ischämie erschöpft sich die ATP-Menge und die ATP-abhängigen Transportvorgänge kommen zum Erliegen. Zudem wird das Zytoskelett zerstört und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Bindungen lösen sich auf (4). Die proximale Tubuluszelle besitzt eine typische und funktionell wichtige Polarität u.a. bezüglich der Verteilung der Membranproteine. Sie entsteht durch spezielle Interzellkontakte, die Tight junctions genannt werden. Diese verbinden einerseits benachbarte Zellen untereinander und bilden andererseits eine intrazelluläre Barriere, welche die Apikalregion von der Basis sowohl elektrisch als auch funktionell trennt. Diese Barriere geht relativ früh im ischämischen Geschehen verloren (Abbildung 2) (9). Dabei wandert u.a. die basolateral gelegenen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ auf die luminal Seite des Tubulus. Ihre Aufgabe ist es, einen intrazellulären Na^+ -Gradienten aufzubauen, das die Na^+ - und Wasserresorption ermöglicht. Durch den Zusammenbruch der Polarität wird vermindert Na^+ resorbiert. In der Macula densa des distalen Tubulus wird die erhöhte Na^+ -Konzentration gemessen und führt über den tubuloglomerulären Rückkopplungsmechanismus zu afferenten Vasokonstriktion (10, 11). So entsteht ein Teufelskreis, in dem die renale Durchblutung weiter abnimmt. Auch der Verlust des Bürstensaums ist ein frühes Ereignis in der Pathophysiologie der ischämischen Schädigung, der die Resorptionskraft weiter mindert (4). Schließlich sezernieren ischämische Tubuluszellen Chemokine und Zytokine und setzen damit die eine sterile Entzündungsreaktion in Gang (11). Es werden Leukozyten rekrutiert, die durch die anschließende Reperfusion vermehrt ins nekrotische Gewebe eingeschwemmt werden und zusätzlich zum Gewebeschaden beitragen. Durch den oxidativen Stress im Rahmen der IR werden vermehrt Sauerstoffradikale gebildet, die v.a. das Tubulusepithel zusätzlich schädigen (9).

Die Extensionsphase ist durch anhaltende Ischämie gekennzeichnet, die Zelluntergang, inflammatorische Prozesse und ein weiterer Abfall der GFR zur Folge hat. In der Stabilisierungsphase erreicht die GFR ihren Tiefstand und bleibt trotz Normalisierung des systemischen Blutdrucks ein bis zwei Wochen auf diesem Stand. In dieser Phase ist auch die Urinausscheidung am niedrigsten und urämische Komplikationen nehmen zu.

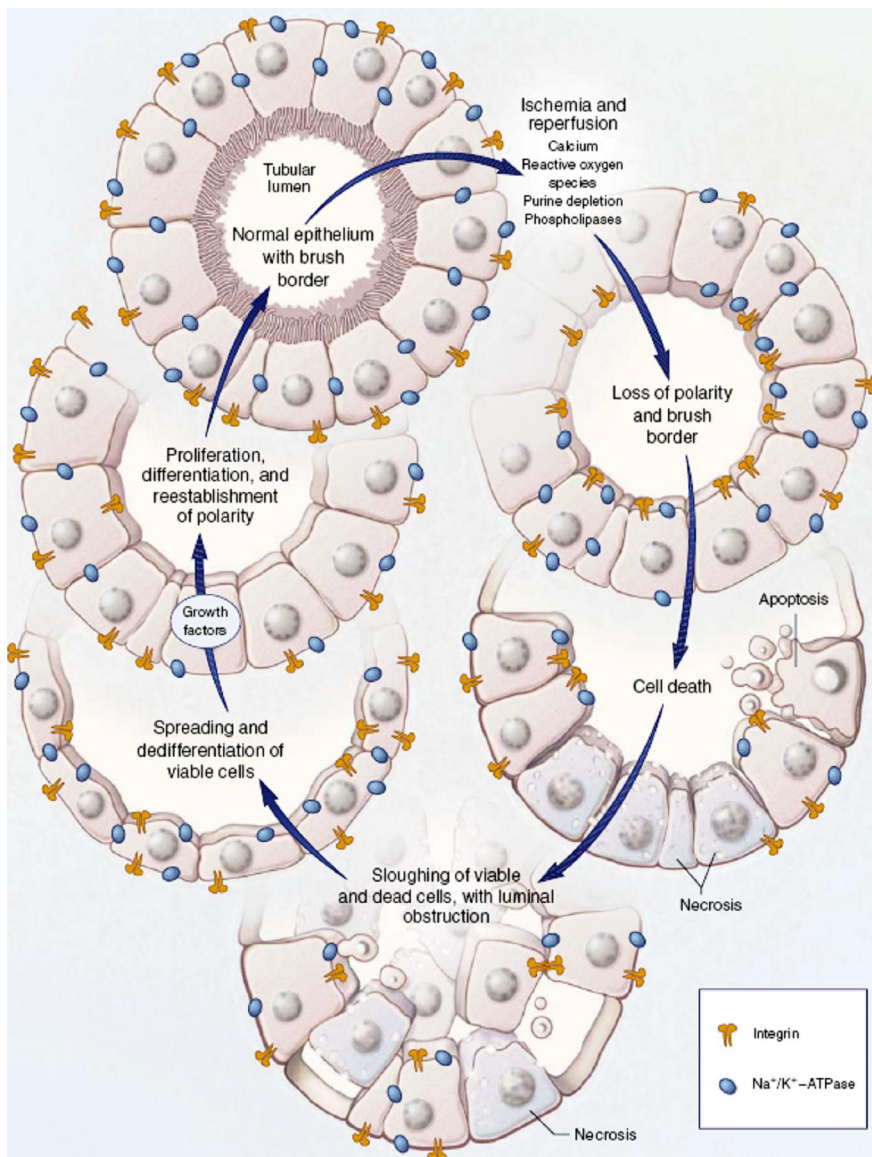


Abbildung 2: Darstellung eines proximalen Tubulus im Verlauf einer ischämischen Schädigung.

In der ischämie-bedingten Schädigung des proximalen Tubulusepithels zeichnet sich zunächst der Verlust des Bürstensaums und der zellulären Polarität ab, dann kommt es zur Zellnekrose. Die nekrotischen Zellen verstopfen z.T. die Tubuli. Durch den Zellverlust erscheint das Tubulusepithel abgeflacht und das Tubuluslumen ist erweitert. Schließlich regeneriert sich das Epithel wieder mit Bildung des Bürstensaums und der Polarität (12).

Gründe für die Persistenz der niedrigen GFR sind noch nicht ausreichend geklärt und vermutlich multifaktoriell bedingt (4). Wahrscheinlich sind eine dysbalanzierte Freisetzung von vasoaktiven Substanzen aus geschädigten Endothelzellen und Entzündungsmediatoren aus Leukozyten und renalen Parenchymzellen Ursache für eine persistierende intrarenale Vasokonstriktion mit konsekutiver medullärer Ischämie (11). Die anschließende Regenerationsphase kann je nach Schädigung bis zu mehreren Wochen dauern. Dabei proliferiert das Tubulusepithel wieder mit Ausbildung des Bürstensaums und der zellulären Polarität (Abbildung 2). Die GFR steigt langsam an. Im Verhältnis zur glomerulären Filtration regeneriert sich die Funktion der Tubuli und Sammelrohre und somit die Rückresorption von Wasser und Elektrolyte nur verzögert. Deshalb kann diese Phase von einer Polyurie geprägt sein (4).

Die toxische Schädigung

Ähnlich wie ischämische Ereignisse in der Niere schädigen vielerlei Toxine hauptsächlich das Tubulussystem, was im ausgeprägten Fall ebenfalls als akute Tubulusnekrose bezeichnet wird. Die toxische Schädigung der Nieren kann durch verschiedene Mechanismen entstehen. Einige Substanzen bewirken eine intrarenale Vasokonstriktion mit anschließender Ischämie, während andere direkt toxisch bzw. über die Bildung von Sauerstoffradikalen indirekt toxisch auf die Tubuluszellen wirken. Manche Medikamente und Toxine präzipitieren in den Tubuli und bilden Zylinder und behindern so die Nierenfunktion. Zu den endogenen Nephrotoxinen zählen u.a. Leichtketten-Immunglobuline, Myoglobin, Hämoglobin, Urat, Oxalat und Kalzium. Während die Leichtketten, die in großen Mengen im Rahmen des Plasmazytoms produziert werden, direkt toxisch auf die Tubuluszellen wirken, entstehen durch Hämoglobin und Myoglobin vermehrt Sauerstoffradikale. Myoglobin wird durch die Schädigung quergestreifter Skelettmuskulatur freigesetzt, was in ausgeprägter Form als Rhabdomyolyse bezeichnet wird. Dies kann unterschiedlichste Ursachen haben: zerebrale Krampfanfälle, exzessive körperliche Betätigung, z.B. ein Marathonlauf, maligne Hyperthermie, schwere Infektionen oder Hyperthyreose. Hämoglobin wird beim Zerfall von Erythrozyten freigesetzt, z.B. beim hämolytischen Transfusionszwischenfall. Urate, die Kristalle der Harnsäure und Oxalate fallen in den Tubuli aus und behindern den Urinabfluss (4). Harnsäure fällt außer bei der Hyperurikämie auch beim sog. Tumorlyse-Syndrom vermehrt an. Es bezeichnet den Zerfall einer großen Anzahl von Tumorzellen während der Chemotherapie, das neben der Uratnephropathie auch das Risiko einer Hyperkaliämie, Hypokalzämie und einer disseminierten Gerinnung trägt (13). Hyperkalzämie induziert v.a. eine renale Vasokonstriktion. Zu den wichtigsten exogenen Nephrotoxinen zählen Röntgenkontrastmittel, Calcineurin-Inhibitoren, einige Antibiotika wie z.B. Aminoglykoside, Antimykotika, v.a. Amphotericin-B und die meisten Chemotherapeutika wie Cisplatin. Die Gefahr einer Kontrastmittel-Nephropathie besteht v.a. bei vorbestehenden Erkrankungen, die die Nieren belasten. Dazu gehören, wie bereits beschrieben u.a. die Herzinsuffizienz, hypovolämische Kreislaufzustände und das Plasmazytom. Allerdings ist auch die Dosierung des Kontrastmittels von Bedeutung. Es wirkt einerseits über die Bildung von Sauerstoffradikalen toxisch auf das Tubulusepithel und andererseits induziert es zudem eine renale Vasokonstriktion. Cyclosporin und Tacrolimus, zwei Calcineurin-Inhibitoren sind ebenfalls vasokonstriktorisch. Die meisten Chemotherapeutika und Antibiotika schädigen direkt die Tubuluszellen. Amphotericin-B ist vasokonstriktorisch und direkt zelltoxisch. Acyclovir, ein gängiges Virustatikum präzipitiert in den Tubuli (4).

1.2. Das Immunsystem

Es wird angeborenes bzw. unspezifisches von adaptivem bzw. spezifischem Immunsystem unterschieden, wobei die enge Zusammenarbeit beider Systeme von entscheidender Bedeutung ist. Nach einer Infektion kann die Immunantwort zeitlich in drei Phasen gegliedert werden: angeborene Immunität (sofort, 0-4 Stunden), früh-induzierte Reaktionen (4-96 Stunden) und spät-induzierte / adaptive Immunität (>96 Stunden) [Abbildung 3] (14).

1.2.1. Das angeborene Immunsystem

Die vorderste Frontlinie der Immunabwehr stellen die Mechanismen des angeborenen Immunsystems dar, durch die eindringende Erreger ohne Induktionszeit sofort bekämpft und in den ersten Stunden in Schach gehalten werden. Zu den Effektorzellen der angeborenen Immunität zählen Gewebsmakrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Mastzellen, die sich alle aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark entwickeln. Makrophagen stellen die gereifte Form der Monozyten dar, die zunächst im Blut zirkulieren und schließlich im Gewebe resident werden. Dort warten sie auf eindringende Mikroorganismen und phagozytieren diese dann (14). Dadurch werden sie aktiviert und sezernieren anschließend Zytokine und Chemokine und setzen somit eine Entzündungsreaktion in Gang.

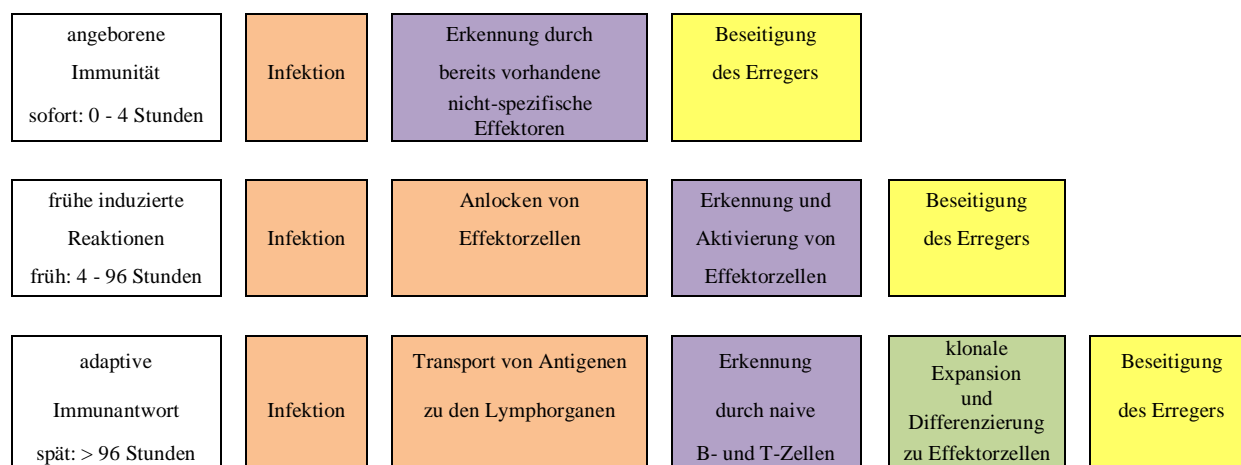


Abbildung 3: Immunreaktion auf erstmalige Infektion verläuft in drei Phasen. Die ersten beiden Phasen sind Bestandteile der angeborenen Immunität und beruhen auf keimbahnkodierte Rezeptoren. Die Reaktionen laufen schnell an und sind relativ gleichförmig. Die erworbene Immunität hat variable antigenspezifische Rezeptoren, die durch Genumlagerung entstehen. Sie setzt spät ein, da die wenigen B- und T-Zellen nach der Aktivierung zunächst klonal expandieren und zu Effektorzellen differenzieren müssen (14).

Zytokine beeinflussen umliegende Zellen. Sie aktivieren z.B. andere Immunzellen oder erhöhen die Permeabilität von Gefäßepithelien, um die Migration von Immunzellen zum Infektionsherd zu erleichtern. Chemokine dienen der Chemotaxis weiterer Immunzellen, z.B. der früh einwandernden neutrophilen Granulozyten. Dendritische Zellen stellen eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Unreife dendritische Zellen sind ebenfalls geweberesident und sind phagozytisch und makropinozytisch (Aufnahme von großen Mengen extrazellulärer Flüssigkeit) aktiv. Nach Aufnahme eines Pathogens reifen sie und wandern zu den Lymphknoten. Dort präsentieren sie das Antigen den Lymphozyten und aktivieren somit das adaptive Immunsystem. Granulozyten lassen sich in Neutrophile, Eosinophile und Basophile einteilen. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion wandert relativ früh eine große Anzahl von Neutrophilen zum Infektionsherd. Sie zählen neben Makrophagen und dendritischen Zellen ebenfalls zu den Phagozyten und spielen v.a. bei bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle. Eosinophile werden hauptsächlich durch allergische Entzündungen mobilisiert und Basophile sind bei Parasiteninfektionen beteiligt. Mastzellen spielen ebenfalls bei allergischen Reaktionen eine Rolle (14).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das sogenannte Komplementsystem, das sich aus vielen verschiedenen Plasmaproteinen zusammensetzt. Die Proteine liegen inaktiv in den Geweben und Körperflüssigkeiten vor und werden über eine getriggerte enzymatische Kaskade aktiviert. Sie kann über verschiedene Wege, z.B. durch Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch die Pathogenoberfläche direkt angestoßen werden. Aktivierte Komplementfaktoren binden u.a. an Pathogenoberflächen und markieren sie für Phagozyten (Opsonierung). Einige Faktoren wirken als Chemotraktoren, andere erzeugen Poren in Bakterienmembranen und lysieren sie dadurch (14).

Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Die Erkennung der Mikroorganismen durch Immunzellen erfolgt über zahlreiche extrazelluläre, intrazelluläre und membrangebundene Rezeptoren oder Moleküle. Im Gegensatz zur adaptiven Immunität sind die Rezeptoren keimbahnkodiert. Das bedeutet, dass sie durch die Gene festgesetzte Strukturen besitzen und nicht an Veränderungen der Erreger bzw. des Erregerspektrums adaptierbar sind. Sie erkennen allerdings zahlreiche evolutionär konservierte Muster von wiederholten Strukturmotiven auf Pathogenen, die im Englischen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) genannt werden. Die Rezeptoren und Mustererkennungsmoleküle werden daher als

špattern recognition receptorsō (PRR) bezeichnet (14). Abbildung 4 zeigt Beispiele für Mustererkennungstrukturen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Anders als im adaptiven Immunsystem besteht keine klonale Verteilung der Rezeptoren. Vielmehr kommt ein bestimmter Satz von Rezeptoren bei allen Zellen eines Typs vor. Die Rezeptoren der angeborenen Immunität haben vielfältige Funktionen. Auf Phagozyten dienen sie z.B. der Pathogenerkennung und der anschließenden Aufnahme. Es gibt chemotaktische Rezeptoren, die bakterielle Peptide erkennen und Neutrophile zum Infektionsherd locken. Über einige Rezeptoren wird die Synthese und Ausschüttung von Effektormolekülen induziert, die z.B. die anschließende adaptive Immunantwort beeinflussen oder eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Dies ist bereits Bestandteil der früh-induzierten Reaktionen des angeborenen Immunsystems (14).

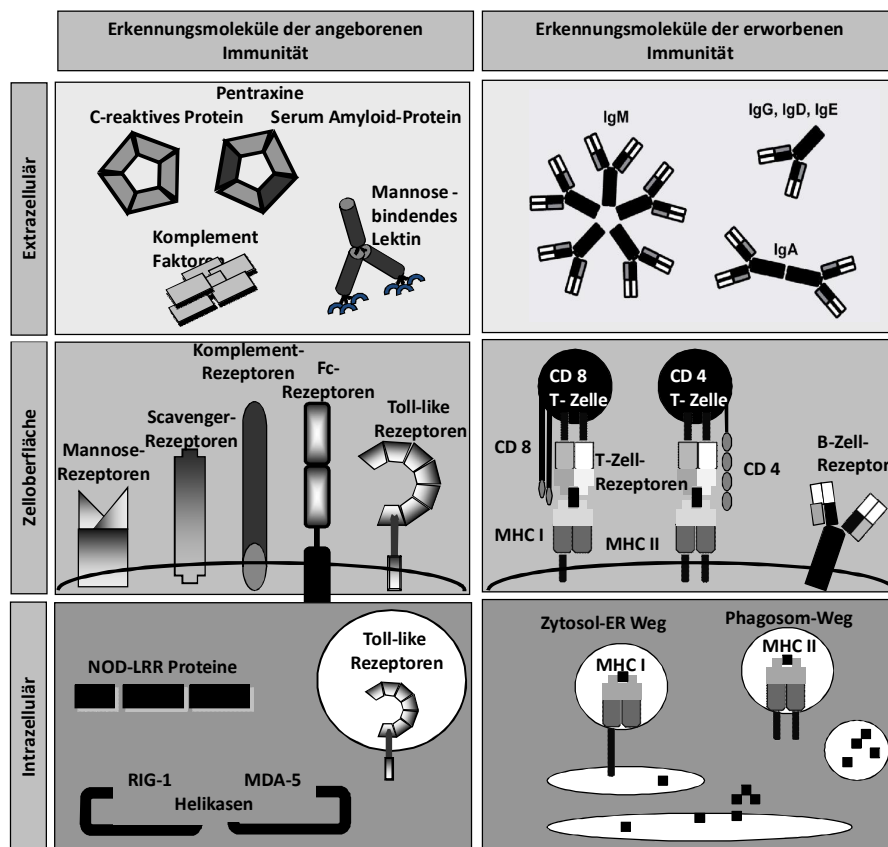


Abbildung 4: Mustererkennungsmoleküle und Rezeptoren des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Mit verschiedenartigsten Molekülen und Rezeptoren werden spezifische Strukturen von Pathogenen erkannt. Während das angeborene Immunsystem allerdings evolutionär konservierte PAMPs erkennt, ist das adaptive Immunsystem in der Lage, sich an spezifische Erreger anzupassen (Prof. HJ. Anders).

Toll-like-Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren erhielten ihren Namen von den Toll-Proteinen, die ursprünglich in der *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden (15). In der Fruchtfliege sind die Toll-Proteine u.a. für die embryonale Entwicklung (16) und die Pilzabwehr (17) verantwortlich.

Toll-like Rezeptoren sind Typ-1-Transmembranrezeptoren mit einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne (LRR = leucin- rich repeats). Die intrazelluläre Domäne ist homolog zu der des IL-1-Rezeptors und wird entsprechend Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne genannt. Es wurden bisher 10 humane (TLR1-10) und 12 murine (TLR1-9 und 11-13) TLRs entdeckt, die z.T. homolog sind (18). TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind in endosomalen Membranen und der Rest in Plasmamembranen lokalisiert (Abbildung 5). Sie werden hauptsächlich in Immunzellen, aber auch in nicht-Immunzellen wie z.B. glomeruläre Zellen und Tubulusepithelzellen exprimiert. Toll-like-Rezeptoren sind wichtige Pathogenerkennungsrezeptoren (PRR) der angeborenen Immunität und werden durch spezifische Liganden aktiviert (Tabelle 2). Neben den membranständigen TLRs gibt es noch zytosolische PRR: *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like* Rezeptoren (NLR) und *retinoic-acid-inducible protein (RIG)-like* Helikasen (RLH), zu denen MDA5 und RIG1 gehören (19). Nach der Ligandenbindung bilden TLRs Homo- oder Heterodimere und rekrutieren intrazelluläre Adaptermoleküle.

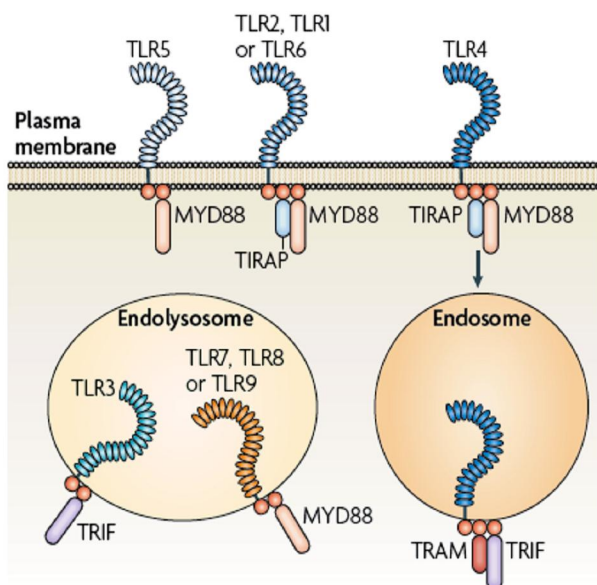


Abbildung 5: Toll-like Rezeptoren und ihre Adaptermoleküle.

TLR-1, -2, -4, -5 und -6 befinden sich auf Plasmamembranen, während die restlichen TLRs in endosomalen Membranen lokalisiert sind. Sie rekrutieren folgende Adaptermoleküle: MyD88, TIRAP, TRAM und TRIF. Dabei wird zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signaltransduktionen unterschieden (20).

Tabelle 2: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (19)

Pathogen	Molekulares Muster	Toll-like Rezeptor
<u>Bakterienwand</u>		
alle Bakterien	Peptidoglykan	TLR2
Gram-negative Bakterien	Lipopolysaccharide	TLR4
Gram-positive Bakterien	Triacy-Lipopeptide	TLR1 / TLR2
	Lipoteichonsäure	TLR2 ó TLR6
	Diacyl-Lipopeptide	TLR2 ó TLR6
	Porine	TLR2
Mykobakterien	Lipoarabinomannan	TLR2
	Triacy-Lipopeptide	TLR1 / TLR2
<u>Mikrobielle und virale Nukleinsäure</u>		
DNA	CpG-DNA	TLR9
RNA	ds-RNA	TLR3
	ss-RNA	TLR7, TLR8
<u>andere Pathogenbestandteile</u>		
Flagellen	Flagellin	TLR5
uropathogene E.coli	?	mTLR11
Proteine der viralen Hülle	RSV-Hüllprotein	TLR4
	Masern-Virus-Hämagglutinin	TLR2
	CMV, HSV1-Proteine	TLR2
Zellwand von Pilzen	Candida-Phospholipomannan	TLR2
	Candida-Mannan	TLR4
	Saccharomyces Zymosan	TLR2 / TLR6

Die folgenden vier Adaptermoleküle sind an der TLR-Signaltransduktion beteiligt (Abbildung 5): MyD88, *TIR domain-containing adaptor protein inducing INF* (TRIF), *TRIF related adaptor molecule* (TRAM) und TIR-assoziertes Protein (TIRAP). Dabei unterscheidet man zwischen MyD88-abhängiger (MyD88 + TRAF6 + IRF5 + NF- κ B) und MyD88-unabhängiger (TRIF + TRAF6 + IRF3 + NF- κ B) Signaltransduktion (Abbildung 6) (19, 20). TLR4 ist der einzige Rezeptor, der sowohl die MyD88-abhängige als auch die unabhängige Signalkaskade aktivieren kann. TLR3 signalisiert nur über den MyD88-unabhängigen und die restlichen TLRs nur über den MyD88-abhängigen Weg (21).

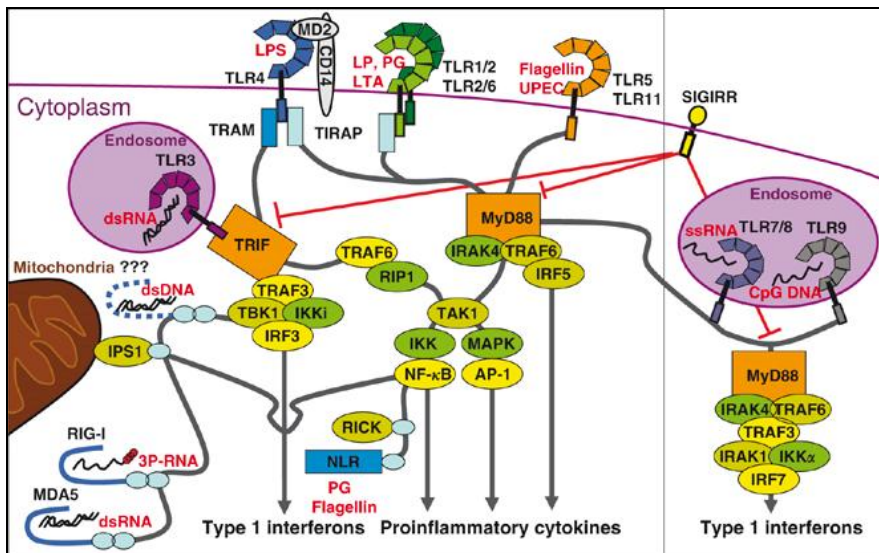


Abbildung 6:
Signaltransduktion durch TLRs und zytoplasmatische PRR. Nach Ligandenbindung werden intrazelluläre Signalkaskaden initiiert. Dabei werden zunächst Adaptermoleküle rekrutiert, die mit weiteren Proteinen Komplexe bilden. Letztendlich werden proinflammatorische Zytokine und Interferone induziert (19).

Die initiierten Signalkaskaden führen über die Aktivierung von NF- κ B, MAPK und Interferon-regulierenden Faktoren zur Induktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone (18, 19) (Abbildung 6). Interessanterweise sind TLR2 und TLR4 in der Pathogenese der IR-bedingten Schädigung in der Niere beteiligt (19). Daher ist anzunehmen, dass auch endogene TLR-Liganden existieren.

Induzierte Reaktionen des angeborenen Immunsystems

Die nächste Phase der Immunantwort beschreibt die früh-induzierten Reaktionen des angeborenen Immunsystems, die im Gegensatz zum adaptiven System kein immunologisches Gedächtnis bilden. Dazu gehören die Wirkungen der Zytokine und Chemokine, die nach Pathogenkontakt sezerniert wurden. Von aktivierten Makrophagen werden z.B. IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8 oder IL-12 freigesetzt. Beispielsweise werden Gefäßendothelien durch IL-1 und TNF- α aktiviert. Das bedeutet, dass sie vermehrt Adhäsionsmoleküle, wie Selektine und interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) produzieren und in die Membran einlagern, um die Migration von Immunzellen zu ermöglichen (14). Integrine sind ebenfalls Adhäsionsmoleküle, die allerdings auf der Oberfläche von Leukozyten zu finden sind. Dabei sind neutrophile Granulozyten, die ersten Zellen, die Gefäßwände durchdringen und zum Infektionsherd wandern. TNF- α erhöht zudem die Gefäßpermeabilität, das ebenfalls den Zustrom von Zellen und Proteine erleichtert. Neben den lokalen Effekten hat es allerdings auch starke systemische Wirkungen, wie Fieberentwicklung oder Schock. IL-1, IL-6 und TNF- α lösen auch die sogenannte Akute-Phase-Reaktion aus, bei der Akute-Phase-Proteine, wie

CRP, Pentraxine oder Kollektine in der Leber vermehrt gebildet werden. Einige davon aktivieren das Komplementsystem, während andere direkt opsonierend wirken (14). Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine und locken Immunzellen zum Entzündungsherd. Eine weitere wichtige Gruppe von Molekülen im angeborenen Immunsystem sind die Interferone (INF), die für die Virusbekämpfung wichtig sind. Sie lassen sich in drei Gruppen (INF- , IFN- und IFN-) unterteilen, während sich die ersten beiden stark von IFN- unterscheiden. Sie werden von virusinfizierten Zellen sezerniert. Umliegende Zellen werden v.a. durch die Wirkung von INF- und INF- virusresistent und erhöhen die MHC-1-Bildung zur effektiveren Pathogenpräsentation. Zudem werden NK-Zellen aktiviert, die virusinfizierte Zellen abtöten (14).

1.2.2. Das adaptive Immunsystem

Je nach Immunlage und Infektionsschwere können jeweils beide Phasen des angeborenen Immunsystems ausreichen, um die Erreger zu beseitigen. Gelingt dies nicht, bedarf es der erregerspezifischen Abwehr des adaptiven Immunsystems, das durch Zellen und Moleküle des angeborenen Systems aktiviert wird (14). Die adaptive Immunität zeichnet sich dadurch aus, dass spezifische Antikörper gegen Pathogenbestandteile erzeugt werden. Dies ist nur möglich, weil sie durch rekombinierbare Gene kodiert werden. So kann sich der Organismus an die Veränderungen der Erreger bzw. des Erregerspektrums anpassen (14). Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten. Zur Aktivierung sowohl der T- als auch der B-Lymphozyten werden ihnen Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (APC) im Lymphknoten präsentiert. Dies bedarf zusätzlich einer Kostimulation, die bei T-Zellen meist über antigenpräsentierende DCs und bei B-Zellen über aktivierte T-Zellen erfolgt. Neben DCs gehören auch Makrophagen und B-Lymphozyten zu den antigenpräsentierenden Zellen. Anschließend erfolgt die klonale Expansion des aktivierten Lymphozyten. B-Zellen differenzieren zu großen Plasmazellen, die dann antigenspezifische Antikörper produzieren. Dies ist sehr zeitaufwändig und wäre nicht möglich, wenn die Mechanismen der angeborenen Immunität nicht im Vorfeld die Infektion in Schach halten würde (14). Neben der Spezifität und der Anpassungsfähigkeit ist die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses ein weiterer wichtiger Aspekt des adaptiven Systems. Es verkürzt die Reaktionszeit beim erneuten Auftreten desselben Erregers erheblich (14).

1.2.3. Immunreaktionen durch Ischämie-Reperfusion in der Niere

Im Rahmen der IR in der Niere werden neben der unmittelbaren hypoxiebedingten Zellschädigung, Immunreaktionen ausgelöst, die nicht protektiv sind, sondern maßgeblich zum Zellschaden beitragen (22). Dabei spielt v.a. das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle. Neben den Mediatoren des Immunsystems sind sowohl Tubulusepithel- und Gefäßendothelzellen aktiv am IR-bedingten Entzündungsgeschehen beteiligt (23). Bereits eine Stunde nach renaler IR werden Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Leukozyten hochreguliert, die zur verstärkten Leukozyteninfiltration und Entzündungsreaktion führen (Abbildung 7). Entscheidend aber für eine verstärkte Schädigung ist die ischämie-bedingte Dysfunktion des Endothels. Hypoxiebedingt werden Zelladhäsionen und Zytoskelett verändert, das zum Verlust von Zell-Zell-Kontakte und zum Ablösen des Endothels von der Basalmembran führt (23). Die gestörte Integrität des Endothels ist u.a. für dessen erhöhte Permeabilität mit verantwortlich. Dadurch erhöht sich zusätzlich die Infiltration von Immunzellen und Molekülen. Durch die vermehrte interstitielle Flüssigkeitsansammlung werden aber zudem peritubuläre Kapillaren komprimiert. Das stagnierte Blut in diesem Bereich aktiviert das Gerinnungssystem und löst Entzündungsreaktionen aus (14).

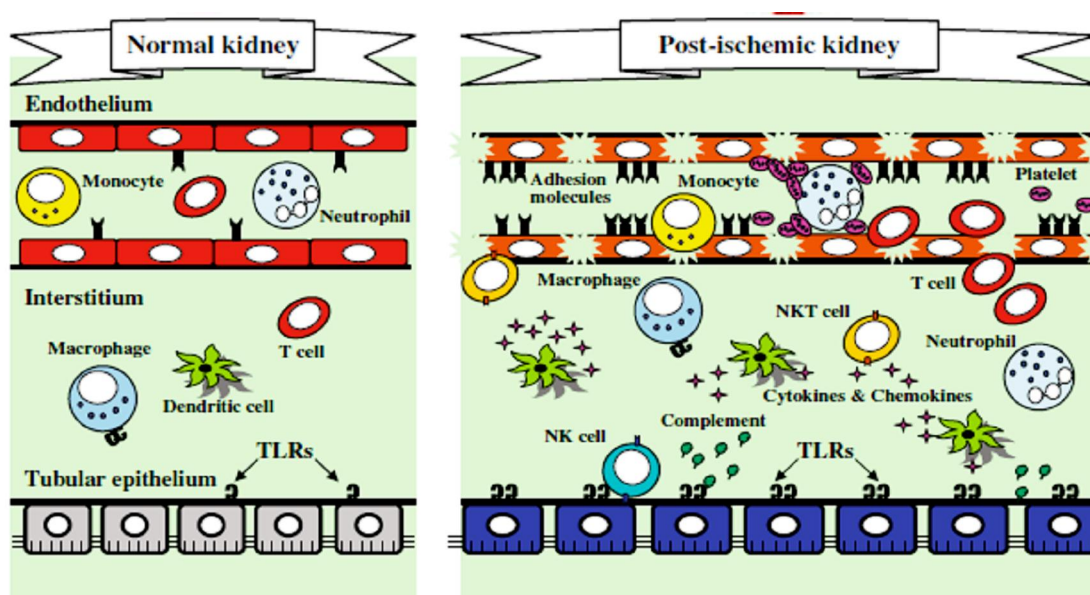


Abbildung 7: Immunreaktionen in der postischämischen Niere. Die ischämiebedingte Entzündungsreaktion wird eingeleitet durch einen starken Influx von Immunzellen, bedingt durch eine frühe Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten. Die erhöhte vaskuläre Permeabilität begünstigt zusätzlich den Zustrom von Entzündungsmediatoren. Tubulusepithelzellen steigern die TLR-Expression und sezernieren ebenfalls Zytokine und Chemokine (23).

Letztlich wird dadurch die endotheliale Dysfunktion verstärkt und ein Teufelskreis entsteht, der die renale Perfusion beeinträchtigt und zu verlängerter Hypoxie führt (24). Da aktivierte Endothelzellen auch Zytokine und Chemokine sezernieren (22), tragen freigesetzte aktivierte Endothelzellen möglicherweise auch zu entfernten Organläsionen bei, z.B. in der Lunge (25). Auch das Tubulusepithel trägt zum Entzündungsgeschehen bei. Früh schon werden nach renaler IR Toll-like-Rezeptoren (TLRs) hochreguliert (Abbildung 7) (23), über die u.a. freigesetzte Bestandteile nekrotischer Zellen detektiert werden (26). Diese freigesetzten zellulären Bestandteile werden im Englischen in Anlehnung an den Begriff *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) als *danger/damage-associated molecular pattern* (DAMPs) bezeichnet. Während PAMPs Bestandteile pathogener Mikroorganismen bezeichnet, sind DAMPs Bestandteile aus körpereigenen Zellen. Allerdings ist nicht klar, ob DAMPs grundsätzlich aus wiederholenden Strukturmustern bestehen, wie es bei PAMPs der Fall ist (26). Der Großteil der DAMPs wird präformiert im Zytosol von Körperzellen aufbewahrt und wird durch nekrotischen Zelluntergang, nicht jedoch durch Apoptose freigesetzt (Abbildung 8). DAMPs werden ähnlich wie PAMPs über Rezeptoren u.a. über TLRs detektiert, lösen Entzündungsreaktionen aus und aktivieren das adaptive Immunsystem. Sie können bezüglich ihrer Herkunft und Aktivität in zwei große Kategorien eingeteilt werden (Tabelle 3). Intrazelluläre DAMPs stammen direkt aus nekrotischen Zellen und wirken unmittelbar stimulatorisch auf Immunzellen. Andere intrazelluläre Zellbestandteile schaffen extrazelluläre DAMPs, indem sie präformierte extrazelluläre Mediatoren, wie z.B. Komplementfaktoren oder Antikörper aktivieren und somit indirekt immunstimulatorisch wirken (26). Auf Tubulusepithelzellen werden TLR1, 2, 3, 4 und 6 konstitutiv exprimiert (27), wobei TLR2 und TLR4 durch IR vermehrt exprimiert werden. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Blockade dieser beiden Rezeptoren die IR-bedingten Gewebeschäden und das ANV reduzieren. Desweiteren konnte durch Experimente mit Knochenmarks-Transplantationen gezeigt werden, dass TLR2 und TLR4-Expression in Tubulusepithelzellen im Vergleich zu myeloischen Zellen die größere Bedeutung hinsichtlich Entzündungsreaktion und Gewebeschaden hat (28, 29). Die Induktion von Zytokinen wie TNF- α , IL-6, IL-1 β , und TGF- β und Chemokinen wie MCP-1 oder IL-8 (22) erfolgt sowohl über den MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalweg (30) (31). Die proinflammatorische Aktivität von Tubulusepithelzellen konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden. Nach Stimulation mit Sauerstoffradikalen, die unter oxidativen Stress vermehrt produziert werden, exprimieren Zellen aus dem S3-Segment des proximalen Tubulus den Interferon-regulierenden Faktor (IRF)-1. IRF1 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach renaler IR früh induziert wird und proinflammatorische Gene aktiviert (32).

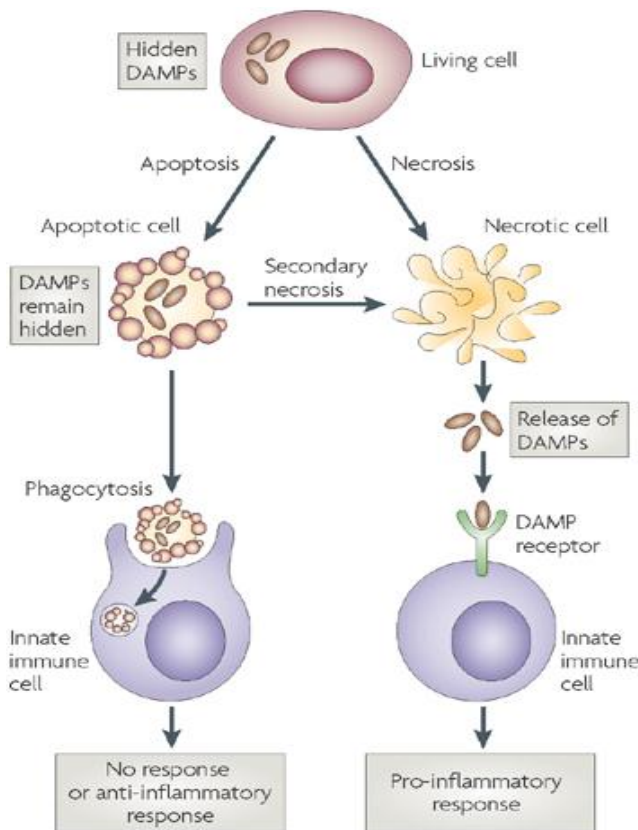


Abbildung 8: Freisetzung von DAMPs durch nekrotischen Zelluntergang.

DAMPs sind Bestandteile körpereigener Zellen, die zum Großteil im Zytosol der Zelle aufbewahrt und erst durch nekrotischen Zelluntergang freigesetzt werden. Im organisierten apoptotischen Zelluntergang bleiben DAMPs versteckt und lösen im Gegensatz zur Nekrose keine Immunreaktionen aus (26)

Interessanterweise können Tubulusepithelzellen zu semiprofessionellen Phagozyten transformiert werden. Geschädigte Tubulusepithelzellen exprimieren vermehrt das Oberflächenmolekül KIM1, über den die Phagozytose von abgestorbenen Zellen induziert wird (33). Dies trägt vermutlich ebenfalls zur Modulation der Immunreaktion in der akut geschädigten Niere bei. Durch renale IR werden entlang der Basalmembran des Tubulusepithels Komplementfaktoren aktiviert, da der Komplement-inhibierende Faktor Crry auf der basolateralen Seite des Epithels verloren geht. Dies geschieht im Rahmen des ischämie-bedingten Polaritätsverlusts der Tubuluszellen (34). In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass dabei nur der alternative Weg der Komplementaktivierung eine Rolle spielt (35, 36). Ähnlich wie in der mikrobiellen Infektion werden auch im sterilen Entzündungsgeschehen früh vermehrt Neutrophile und Makrophagen rekrutiert, die phagozytisch aktiv sind und Zytokine und Chemokine sezernieren. Aktivierte Neutrophile können ebenfalls Sauerstoffradikale freisetzen (22, 37), die das Tubulusepithel weiter schädigen. Ob Neutrophile grundsätzlich protektiv sind oder den Gewebeschaden verstärken, wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert (38, 39).

Tabelle 3: Intra- und extrazelluläre DAMPs und ihre Rezeptoren (26)

DAMPs	Potentielle Rezeptoren
<u>Intrazelluläre DAMPs</u>	
HMGB1	RAGE, TLR2, TLR4
Harnsäure	TLR2, TLR4, CD14
Cromatin, Nukleosome, DNA	TLR9 mit BCR oder Fc-Rezeptor
Hitze-Schock-Proteine (HSP)	CD14 (HSP70, HSP60)
	CD91 (HSP70, HSP90, GP96, Calreticulin)
	Scavenger Rezeptoren (HSP70, GP96, Calreticulin)
	TLR4 (HSP60)
	TLR2/4 (HSP60, GP96)
	CD40 (HSP70)
ATP	P1, P2X, P2Y Rezeptoren (ATP-Rezeptoren)
Adenosin	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃ Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren)
Galektin	CD2
Thioredoxin	---
S-100 Proteine	RAGE
Cathelicidin	FPRL-1
Defensine	CCR6, TLR4
<i>N-formylated peptide</i>	FPR, FPRL-1
<u>Extrazelluläre DAMPs</u>	
Hyaluronsäure	CD44, TLR2, TLR4
Heparansulfat	TLR4
Fibrinogen	TLR4, Integrine
Kollagen	CXCR2
Fibronectin	Integrine
Elastin	Integrine
Laminin	Integrine

Auch DCs spielen eine entscheidende Rolle in der ischämiebedingten akuten Nierenschädigung. Sie werden nachfolgend gesondert besprochen.

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass das adaptive Immunsystem ebenfalls an den IR-getriggerten Immunreaktionen beteiligt ist (23), wenn auch nicht in dem Umfang wie das angeborene Immunsystem. Sowohl T-Zell- als auch B-Zell-Defizienz (40) schützt vor IR-bedingter Schädigung, wobei Subpopulationen unterschiedlich beteiligt sind. So tragen nur CD4-positive T-

Zellen zur Schädigung bei, nicht jedoch CD8-positive T-Zellen (41). T-Zellen erhöhten zudem ebenfalls die endotheliale Permeabilität (42), vermutlich über Zytokinproduktion. Über Depletionsexperimente von regulatorischen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass deren immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung auch im IR-Setting von Bedeutung ist (43).

Dendritische Zellen in der renalen Ischämie-Reperfusion

DCs sind entscheidend an der frühen Entzündungsreaktion nach IR in der Niere beteiligt. Residente DCs sind die stärkste vertretene Zellpopulation in der gesunden Niere (44), die relativ spezifisch den Oberflächenmarker CD11c exprimieren (45). Sie sind in der ganzen Niere verteilt und verweilen hauptsächlich im Interstitium (46). Renale DCs entstammen der myeloischen Zellreihe aus dem Knochenmark und sind bei genauer Betrachtung eine sehr heterogene Population in der Niere. Es wird vermutet, dass diese Heterogenität durch unterschiedliche regionale Faktoren entsteht, die zu unterschiedlicher Differenzierung der DCs führt (45). Beispielsweise sind nach renaler IR F4/80-positive DCs hauptsächlich am kortikomedullären Übergang in der Niere lokalisiert. Diese Region reagiert sehr empfindlich auf hypoxische Zustände und weist nach IR die stärksten Gewebeschäden auf. Vermutlich werden durch den hohen Anteil endogener Liganden in diesem Bereich DCs verstärkt stimuliert (47). Für die Differenzierung und das Überleben von myeloischen DCs wird der Wachstumsfaktor CSF-1 benötigt. Interessanterweise wird er vermehrt in der Medulla und nicht etwa im Kortex von Parenchymzellen exprimiert und sezerniert (45). Im Interstitium interagieren sie mit verschiedensten Molekülen, die von den Tubuli zu den Gefäßkapillaren transportiert oder von Parenchymzellen freigesetzt werden und mit Immunzellen, Epithelzellen oder Fibroblasten und natürlich mit eindringenden Mikroorganismen (44). DCs sind bekannt dafür, dass sie als potente APCs Pathogene phagozytieren und diese den T-Lymphozyten präsentieren und somit das adaptive Immunsystem aktivieren (14). Aber auch im sterilen Geschehen nach IR in der Niere stellen sie eine Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Analog zur Pathogenerkennung, detektieren sie auch freigesetzte Bestandteile aus nekrotischen Zellen (DAMPs). Dies führt gleichermaßen zur Aktivierung und Differenzierung der DCs und bewirkt deren Migration zu lymphatischen Gewebe, wo sie T-Lymphozyten stimulieren (Abbildung 9) (26, 48). Bevor jedoch das adaptive Immunsystem ins Spiel kommt, initiieren DCs und Makrophagen bereits die frühe Entzündungsreaktion nach IR in der Niere, indem sie Zytokine und Chemokine sezernieren und weitere Effektorzellen wie NK-Zellen aktivieren (44). Es konnte gezeigt werden, dass residente F4/80 / CD11c-doppelpositive DCs im Gegensatz zu einwandernden Immunzellen nach renaler IR die stärksten Produzenten proinflammatorischer

Mediatoren wie TNF- α , MCP-1, RANTES etc. sind. Die Depletion intrarenaler DCs mittels Clodroant-Liposomen führt zu stark reduzierter TNF- α -Sekretion nach IR (47). TNF- α ist ein hochpotentes proinflammatorisches Zytokin, das durch renale IR vermehrt produziert wird. Es trägt zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf renalen Endothelien und somit zur vermehrten Leukozyteninfiltration bei. Desweiteren induziert es weitere proinflammatorische Mediatoren, u.a. TNF- α selbst und potenziert so die Entzündungsreaktion. TNF- α triggert die Apoptose von Tubulusepithelzellen und verstärkt so den Parenchymschaden. Neben seiner Zytotoxizität wirkt es zudem vasokonstriktorisch und reduziert so den glomerulären Blutfluss und die Ultrafiltration (49). Da DCs maßgeblich an der Entzündungsreaktion in der postischämischen Niere beteiligt sind, müssen sie immunologisch reguliert und kontrolliert werden, um überschießende Immunreaktionen zu vermeiden. Es gibt ein komplexes Netzwerk an Regulationsmechanismen mit unzähligen Faktoren, um Immunreaktionen zu regulieren (Abbildung 10).

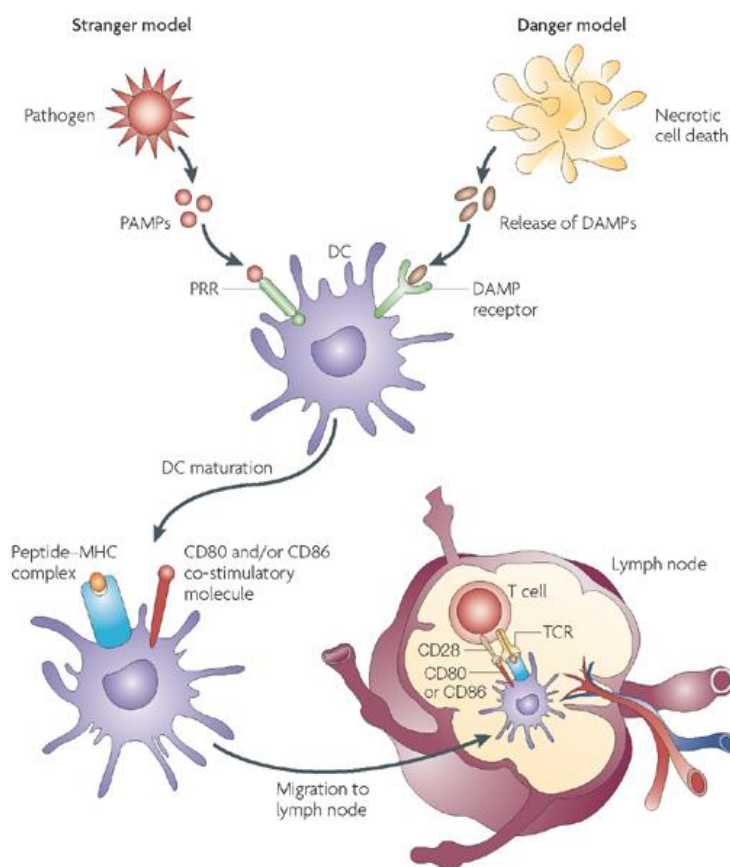


Abbildung 9: Aktivierung von DCs durch PAMPs und DAMPs.

Analog zur Pathogenerkennung über PRR, detektieren DCs auch Bestandteile aus körpereigenen nekrotischen Zellen (DAMPs). Dadurch werden sie aktiviert, differenzieren und wandern zum lymphatischen Gewebe. Dort präsentieren sie die Antigene den T-Zellen und leiten die adaptive Immunantwort ein (26).

In diesem Zusammenhang hat man herausgefunden, dass die proinflammatorische Funktion DCs u.a. mit Hilfe des *single Ig IL-1-related receptor* (SIGIRR) reduziert wird. SIGIRR ist ein Transmembranrezeptor aus der TIR/IL-R-Superfamilie, der TLR-Signaling inhibiert, indem es deren Homo- bzw. Heterodimerformationen moduliert oder mit anderen Komponenten der Signalkaskaden interagiert. Es wird relativ ubiquitär exprimiert; in der Niere sowohl von Tubulusepithelzellen als auch von myeloischen Zellen. Mit Hilfe von SIGIRR-defizienten und chimären Mäusen konnte man zeigen, dass SIGIRR TLR-Signalkaskaden hauptsächlich in renalen DCs inhibiert und so dessen proinflammatorische Funktion reduziert. SIGIRR-defiziente Mäuse entwickeln dementsprechend verstärkte Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden nach renaler IR (50).

1.2.4. Regulationsmechanismen von Immunreaktionen

Die Reaktionen des Immunsystems haben primär die Aufgabe den Organismus vor exogenen und endogenen Gefahren zu schützen. Die exzessive bzw. unkontrollierte Immunaktivierung kann allerdings zu erheblichen Schäden des Organismus führen (51). Wie groß das Zerstörungspotential des Immunsystems sein kann, zeigen eindrücklich Erkrankungen wie der Lupus erythematoses (52) oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen (53). Dabei laufen Entzündungsreaktionen aufgrund von autoimmunologischen Fehlregulationen oder durch genetisch bedingte Immundefekte in unkontrollierter Weise ab und führen zu erheblichen Gewebeschäden. Unter physiologischen Bedingungen wird die immunologische Balance zwischen Nutzen und Zerstörung durch eine große Anzahl von negativregulatorischen Faktoren und Mechanismen gehalten und bilden ein komplexes Regulationsnetzwerk. Dabei spielen die TLR-induzierten Signalkaskaden wieder eine entscheidende Rolle, die auf mehreren Ebenen reguliert werden können: an der Zellmembran, intrazellulär auf verschiedenen Ebenen der Kaskade und auf DNA-Ebene (Abbildung 10) (51). An einigen Beispielen sollen Regulationsmechanismen veranschaulicht werden. An der Zellmembran werden TLR-induzierte Signalkaskaden beispielsweise durch lösliche sTLRs gehemmt. An Makrophagen der Maus konnte gezeigt werden, dass es lösliche *Splice*-Varianten des TLR4-Gens (sTLR4) gibt. sTLR4 wird durch LPS induziert und wirkt in einem negativen Feedbackmechanismus hemmend auf die TLR4-Signaltransduktion (54). Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Vermutlich interagiert sTLR4 mit dem TLR4-Liganden oder dessen Kofaktoren und reduzieren so die TLR4-Aktivierung (51). Ähnliches wird über TLR2 berichtet (55).

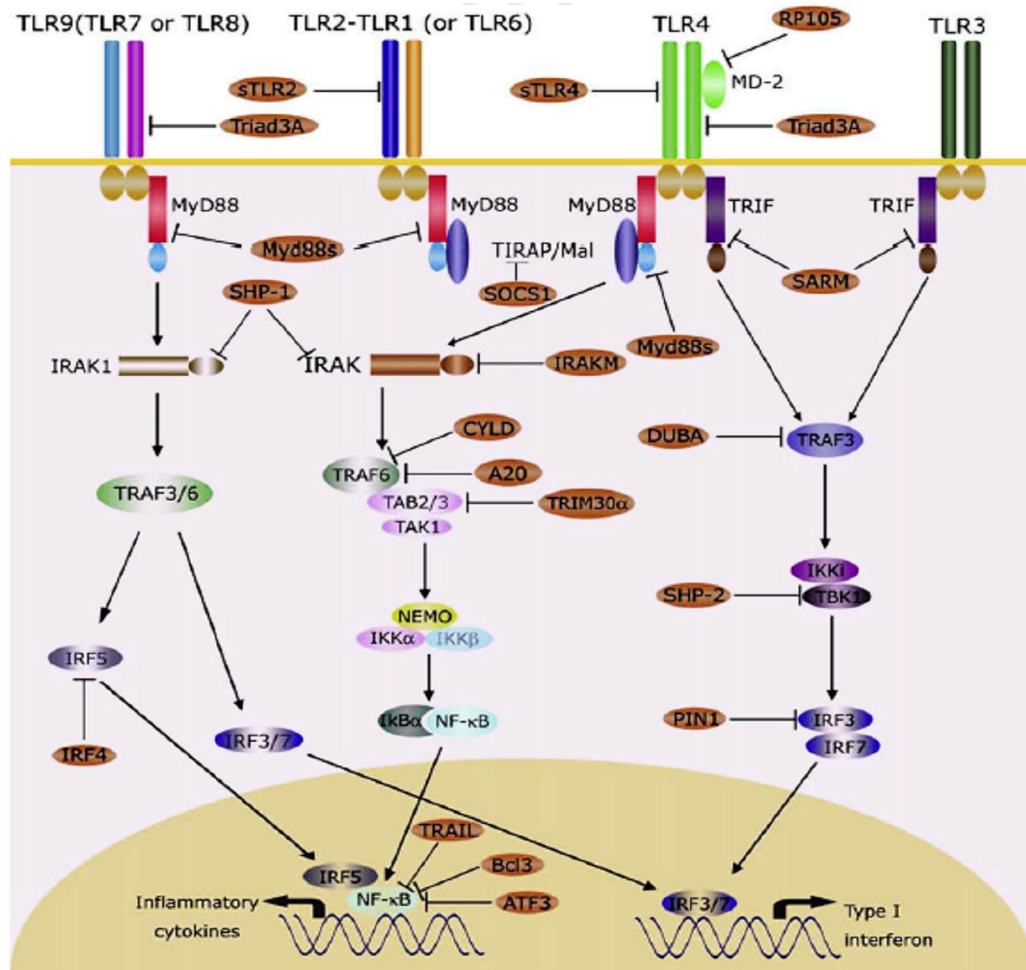


Abbildung 10: Regulation von TLR-Signaling auf verschiedenen Ebenen. Eine Vielzahl von Faktoren (in der Grafik braun markiert) inhibiert TLR-Signalkaskaden extrazellulär, intrazellulär und auf DNA-Ebene. Dadurch werden Immunreaktionen moduliert. Überschießende Entzündungsreaktionen können zu Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen und vermehrten Infektionen führen (51).

Der konstitutiv exprimierte Transmembranrezeptor SIGIRR inhibiert LPS- und IL-1-Signalkaskaden, indem es mit TLR-Adaptermolekülen interagiert (56). Nach renaler IR in Mäusen führt die SIGIRR-Defizienz zu verstärkter Entzündungsreaktion und größerem Gewebeschaden in der Niere (50). Intrazellulär finden sich zahlreiche regulatorische Faktoren, die auf unterschiedlichen Stufen der Signalkaskade wirken. Die IL-1R-assoziierte Kinase M (IRAK-M) ist ein inhibitorisches Protein, das intrazellulär lokalisiert ist und nur in Monozyten exprimiert wird. Es blockiert die Formation von Adaptermolekül-Komplexen an intrazellulären TLR-Domänen und inhibiert somit die nachfolgende NF- κ B-Aktivierung (56). Die IRAK-M-Defizienz resultiert ebenfalls in verstärkter Entzündungsreaktion nach bakterieller Infektion (57).

1.2.5. Interferon-regulierende Faktoren

Die Familie der Interferon-regulierenden Faktoren (IRF) besteht derzeit aus neun humanen und einigen viral kodierten Mitgliedern (58). Sie wurden ursprünglich als Regulatoren des Typ-1-Interferon-Systems bekannt, wobei man mittlerweile weiß, dass sie weitreichendere Funktionen sowohl im angeborenen als auch im adaptiven Immunsystem und auch außerhalb des Immunsystems haben (Tabelle 4). So sind sie an diversen Immunreaktionen, an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt. IRFs sind Transkriptionsfaktoren und haben einen homologen strukturellen Aufbau. Am N-Terminus befindet sich die DNA-Bindungs-Domäne (DBD), die durch 5 Tryptophan-Wiederholungen und einer Helix-Loop-Helix-Struktur charakterisiert ist. Sie ist bei allen IRFs identisch (58, 59). Damit wird eine DNA-Sequenz erkannt, die als *IFN-stimulated response element* (ISRE) bezeichnet wird, da sie ursprünglich in Promoterregionen von Typ-I IFN-induzierbaren Genen gefunden wurde. Mittlerweile weiß man, dass sie auch Promoterbestandteil von IFN-I Gene selbst und vielen anderen Genen ist (60). Am C-Terminus befindet sich die IRF-assoziierte Domäne (IAD), die unter den einzelnen IRFs variiert. IRF1 und IRF2 besitzen IAD-2 und die restlichen IRF-Mitglieder IAD-1. Sie dient der Interaktion mit anderen Faktoren, u.a. auch anderen IRF-Mitgliedern. Je nach Interaktionspartnern werden verschiedene Zielgene aktiviert oder gehemmt (58).

IRF3 und IRF7 sind die wichtigsten Regulatoren der Typ-I IFN-Genexpression nach Virusinfektionen. IRF3 wird konstitutiv exprimiert und verweilt in einer latenten Form im Zytosol. Erst nach einer Virusinfektion transloziert es in den Nukleus und führt zur Induktion von IFN / und Chemokinen. Im Gegensatz dazu liegt IRF7 zunächst nur in kleinen Mengen vor und wird erst nach Virusinfektionen durch IFN-I induziert. Dadurch entsteht ein positiver *Feedback*-Mechanismus, der die Immunantwort in zwei Phasen erheblich verstärkt (Abbildung 11).

Tabelle 4: Subgruppen der IRF-Familie (58)

Subgruppe	IRF-Mitglied
Regulation des IFN-Systems	
a) Regulation der IFN-Induktion	IRF3, IRF7
b) Mediatoren der IFN-Transduktion	IRF2, IRF9
Stressreaktion	IRF1, IRF5
Hämatopoetische IRF	IRF4, IRF8
Morphologische IRF	IRF6

Durch Phosphorylierung werden die Faktoren aktiviert und bilden zusammen Homo- oder Heterodimere und wirken so unterschiedlich auf die Typ-I IFN-Genfamilie. IRF3 ist ein potenter Aktivator von IFN- β -Genen, nicht jedoch von IFN- γ -Genen mit Ausnahme von IFN- γ -4-Genen. IRF7 dagegen aktiviert sowohl IFN- β und IFN- γ -Gene. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass IRF3 für die initiale antivirale Immunantwort verantwortlich ist, während IRF7 erst in die spätere Phase potent eingreift (60). Folgende PRRs sind u.a. in der Signaltransduktion nach viraler Infektion beteiligt: TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-1 und MDA5. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass IRF3 und IRF7 auch nach DNA-Schädigung durch UV-Strahlung aktiviert werden, jedoch über andere Signalwege (58). IRF7 hat zudem eine Bedeutung in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (59).

IRF2 und IRF9 sind ebenfalls entscheidende Mediatoren in IFN-Signalwegen. IRF9 spielt eine wichtige Rolle in der antiviralen Wirkung von Typ-I IFN, ist aber auch in der Geninduktion über das Typ-II IFN-System beteiligt (59). Während IRF9 aktivierend wirkt, hat IRF2 eine hemmende Wirkung auf IFN- β / γ -induzierte Genexpression. IRF2-defiziente Mäuse entwickeln beispielsweise inflammatorische Hauterkrankungen mit CD8(+)-T-Zell-Anomalitäten, die auf eine Überaktivität des IFN- β / γ -Systems zurückzuführen sind (58). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass IRF2 die Entwicklung von NK-Zellen und DCs reguliert. Im adaptiven Immunsystem ist IRF2 beteiligt, indem es die Expression von Proteine für den Antigentransport zu MHC-I (TAP1) stimuliert (59).

Tabelle 5: Die Familie der Interferon-regulierenden Faktoren (58)

IRF-Mitglied	Expression	induzierbar durch
IRF1	ubiquitär	IFN- β , IFN- γ / α , IL-1, γ -Strahlung, Etoposide
IRF2	ubiquitär	IFN- β , IFN- γ / α
IRF3	ubiquitär	---
IRF4	hämatopoetische Zellen	anti-CD3, anti-IgM, anti-CD40, ConA, PMA, HTLV-1-Tax, IL-4, GM-CSF, c-rel
IRF5	ubiquitär	IFN- β / γ , Poly(I:C), Adriamycin, Irinotecan
IRF6	---	---
IRF7	ubiquitär	IFN- β / γ , TNF- α , Etoposide
IRF8	hämatopoetische Zellen	IFN- β , IFN- γ / α
IRF9	ubiquitär	IFN- β , IFN- γ / α

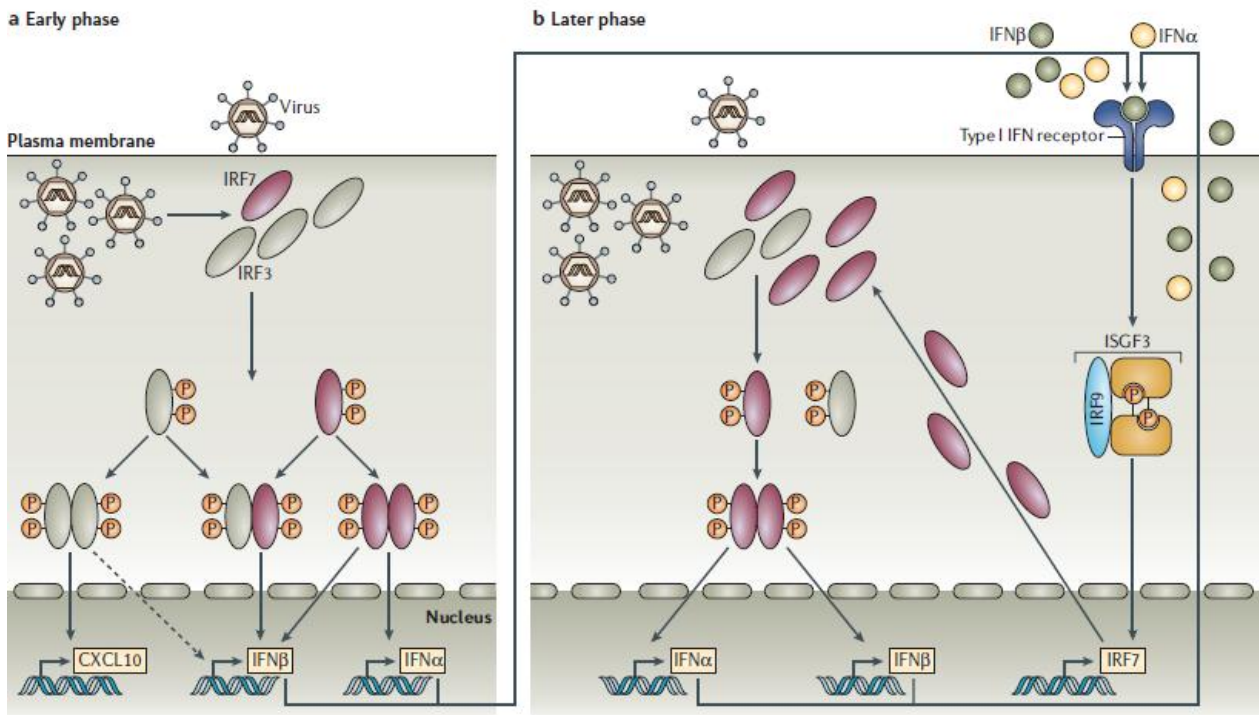


Abbildung 11: IRF3 und IRF7 im positiven Feedback mit Typ-I IFN. In der frühen Phase einer Virusinfektion werden IRF3/7 aktiviert, die die Expression von IFN / und Chemokinen im Nucleus induzieren. Im Verlauf stimulieren IFN / die verstärkte Induktion von IRF7, das schließlich zu einer potente antivirale Immunantwort führt (60).

IRF1 und IRF5 spielen ebenfalls eine Rolle im Typ-I IFN-System, wenn auch keine so entscheidende wie etwa IRF3 und IRF7. Vielmehr weisen sie zudem weitreichendere Funktionen im Immunsystem auf. So ist IRF1 entscheidend an der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Immunzellen beteiligt, reguliert Zellzyklus, Apoptosevorgänge und die Induktion von MHC-I Proteinen (58, 59). IRF1-defiziente Mäuse zeigen Defekte in der Entwicklung von CD8(+)-T-Zellen und NK-Zellen. Sie haben gestörte Th1-Immunantworten und Makrophagen dieser Mäuse sind in der IL-12 Expression beeinträchtigt. Beim Menschen geht die IRF1-Defizienz mit dem myelodysplastischen Syndrom oder Leukämie einher. Desweiteren ist sie mit gestörten UV- und medikamenteninduzierten Apoptosevorgängen assoziiert (59). Es wurde festgestellt, dass IRF2 eine gleiche DNA-Bindungsstelle wie IRF1 erkennt und als kompetitiver Hemmstoff dessen proapoptotische und wachstumsregulierende Funktion hemmt. Die Überexpression von IRF2 resultiert dementsprechend in onkogener Transformation von Zellen (58, 59). Dabei hemmt IRF2 z.B. die IRF1-abhängige Induktion von IFN- und MHC-I Genen (61). Im Typ-I IFN-System spielt IRF1 keine so entscheidende Rolle, auch wenn es Bestandteil sowohl des IFN- - als auch des IFN- -Enhanceosoms ist. Studien haben aber gezeigt, dass es vielmehr in der viralen Abwehr durch IFN- beteiligt. In IRF1-defizienten Mäusen ist nach IFN- -Stimulation die Induktion der NO-Synthetase, der Guanylat-Bindungs-Protein und Il-12p35 reduziert (59).

Tabelle 6: Aktivierung von Interferon-regulierenden Faktoren über PRRs (60)

PRR	Lokalisation	Adapter	aktivierte IRFs
RIG-I	zytosol	CARDIF/IPS1/MAVS/VISA	IRF3, IRF7
MDA5	zytosol	CARDIF/IPS1/MAVS/VISA	IRF3, IRF7, (IRF1)
---	zytosol	---	IRF3
TLR3	Zellmembran / Endosom	TRIF	IRF3, (IRF7)
TLR4	Zellmembran	MyD88, TRAM, TRIF, TIRAP	IRF3, IRF5, IRF8, (IRF7)
TLR7	Endosom	MyD88	IRF4, IRF5, IRF7
TLR9	Endosom	MyD88	IRF4, IRF5, IRF7, IRF8

Abgesehen vom IFN-System hat IRF1 auch eine Bedeutung in der frühen Entzündungsreaktion nach ischämischer Schädigung in der Niere. Es konnte gezeigt werden, dass IRF1 wenige Minuten nach renaler IR von proximalen Tubuluszellen aus dem S3-Segment produziert werden und zur Induktion proinflammatorischer Zytokine führt. IRF1-Defizienz in Mäusen vermindert die postischämische Nierenfunktionsstörung, den Gewebeschaden und die Entzündungsreaktion (32).

Die antivirale Funktion von IRF5 ist noch nicht ausreichend erforscht, aber es gibt Hinweise, dass es auch dabei eine Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Infektionen mit NDV (*Newcastle-Disease-Virus*) und VSV (*vesicular stomatitis Virus*), nicht jedoch durch Sendavirus oder poly I:C phosphoryliert und aktiviert wird. Poly I:C ist eine synthetische Doppelstrang-RNA, die experimentell IFN induziert. Das impliziert, dass die Aktivierung virusspezifisch stattfindet. Die IRF5-Genexpression wird sowohl durch Typ-I IFN als auch durch Virusinfektion induziert (59). Durch in-vitro-Experimente konnten feine Unterschiede zwischen IRF5 und IRF7 bezüglich Geninduktionen von IFN-Subtypen erarbeitet werden. Während IRF5 hauptsächlich IFN-1 induziert, stimuliert IRF7 hauptsächlich IFN-8. Weitere Unterschiede zeigen sich in der Aktivierung von IRF5 und IRF3 bzw. IRF7. IRF3 und IRF7, nicht jedoch IRF5 werden über den TLR3/TRIF-Signalweg aktiviert. IRF5, aber auch IRF7 werden über den MyD88-abhängigen Weg aktiviert, nicht jedoch IRF3 (59). Auch wenn IRF5 vermutlich keine große Bedeutung in der IFN-induzierten antiviralen Immunabwehr besitzt, wird hier deutlich, dass die einzelnen IRFs z.T. überlappend und ergänzend an der antiviralen Abwehr beteiligt sind. Es gibt Beobachtungen, dass Mutationen im IRF5-Gen zu Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses prädisponieren und durch konstitutiver IFN-Produktion charakterisiert ist. Anzumerken ist, dass das IRF5-Gen im Menschen in multiplen *Splice*-Varianten vorkommt (59). Desweiteren kann IRF5 nach DNA-Schädigung Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen (58, 59). Eine weitere bedeutende

Funktion besteht in der transkriptionellen Regulation von früh-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. In IRF5-defizienten Mäusen sind inflammatorische Zytokine wie TNF , IL-6 und IL-12 signifikant runter reguliert, während die IFN- γ -Induktion kaum betroffen ist. In der Präsenz von hohen Konzentrationen von aktiviertem IRF7 ist der Beitrag von IRF5 zur IFN-I Induktion vernachlässigbar. Hier ist die Funktion von IRF5 auf die Induktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen reduziert, die nicht von IRF7 stimuliert werden. Dies impliziert, dass die entscheidende Funktion von IRF5 vielmehr in der Induktion von inflammatorischen Zytokinen zu sehen ist und nicht so sehr von IFN-I (59). Die IRF5-abhängige Expression von proinflammatorischen Zytokinen kann über Ligandenbindung an TLR4, TLR5, TLR7 und TLR9 stattfinden. Nach TLR-Aktivierung interagiert IRF5 mit MyD88 und wird dadurch aktiviert. Nach Dimerisierung transloziert es in den Nukleus und induziert in Kooperation mit NF- κ B die Expression von proinflammatorische Zytokinen und Chemokinen (60). In diesem Zusammenhang fungiert IRF4 als kompetitiver Hemmstoff von IRF5, indem es die gleiche MyD88-Bindungsstelle besetzt und somit dessen proinflammatorische Funktion inhibiert (Abbildung 12).

IRF4 kommt ausschließlich in hämatopoetischen Zellen vor und wird z.T. konstitutiv exprimiert oder nach TLR-Aktivierung induziert (60). Es ist der einzige Faktor dieser Familie, der nicht durch IFN induziert wird (58, 62). Neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor v.a. in der Lymphozyten-Differenzierung und Aktivierung, wie weiter unten beschrieben, fungiert es auch als negativ regulatorischer Faktor im TLR-Signalling, in der die DNA-Bindungsdomäne nicht beteiligt ist (60). Dabei konkurriert es mit IRF5 um dessen MyD88-Bindungsstelle, nicht jedoch mit IRF7, das ebenfalls mit MyD88 interagiert (63). Während IRF5 die zentrale Region von MyD88 bindet, besetzt IRF7 dessen *death*-Domäne (60). In peritonealen Makrophagen geht nach LPS-Stimulation IRF4-Defizienz dementsprechend mit erhöhter Zytokin- und Chemokinexpression einher (64).

Und IRF4-/- Mäuse reagieren hypersensitiv auf DNA-induziertem Schock mit ebenfalls erhöhten Zytokinwerten. Die IRF7-induzierte IFN- γ Expression ist davon nicht beeinflusst (63). In Experimenten zur Untersuchung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn, konnte gezeigt werden, dass IRF4 durch MDP induziert wird und die Entzündungsreaktion im Rahmen der Erkrankung reduziert (65). MDP ist ein Bestandteil von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Wie vorher beschrieben konkurriert IRF4 um die gleiche MyD88-Bindungsstelle wie IRF5 und hemmt dadurch dessen proinflammatorische Funktion (60). Auf DNA-Ebene hat IRF4 eine weitere negativ-regulatorische Funktion.

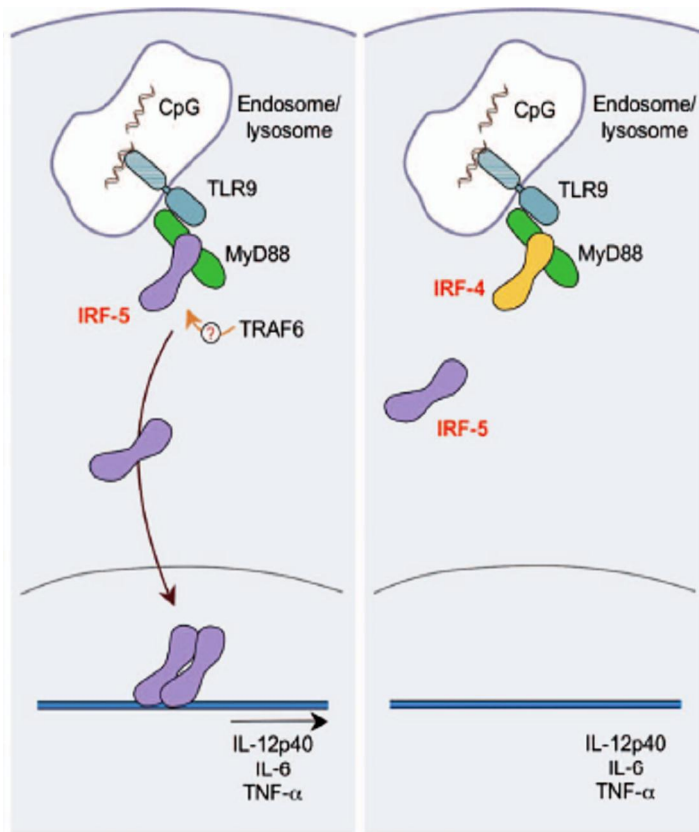


Abbildung 12: IRF4 inhibiert die proinflammatorische Funktion von IRF5. Nach TLR-Aktivierung wird IRF5 MyD88-abhängig aktiviert und induziert in Kooperation mit NF- κ B im Nukleus die Expression proinflammatorischer Zytokine. IRF4 bindet die gleiche MyD88-Bindungsstelle wie IRF5 und inhibiert kompetitiv dessen proinflammatorische Funktion (60, 66).

Es bindet u.a. die gleiche Promotersequenz wie IRF1 und antagonisiert dadurch die IRF1-abhängige Transaktivierung von TRAIL-Genen (61). TRAIL ist ein Typ-2 Transmembranrezeptor und gehört der TNF-Superfamilie an. Über die Interaktion mit *death*-Rezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) induziert er v.a. in Tumorzellen Apoptose. In gesunden Zellen wird diese proapoptotische Aktivität durch *decoy*-Rezeptoren gehemmt. Während die Interaktion mit dem decoy-Rezeptor TRAIL-R3 die weitere Kaskade komplett hemmt, wird über den decoy-Rezeptor TRAIL-R4 NF- κ B aktiviert. Dabei werden Faktoren induziert, die zur Apoptosehemmung führen. (67-69).

IRF4 und IRF8 sind sich in mehrerer Hinsicht sehr ähnlich: Beide werden ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Einzeln weisen sie nur eine schwache DNA-Bindungsaktivität auf, die erst durch Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren wie PU.1, E47 oder auch anderen IRF-Mitglieder wie IRF1 und IRF2 zunimmt (59). Beide Faktoren sind entscheidend an der Entwicklung und Funktionen von B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen beteiligt. Auf unterschiedliche Weise regulieren sie viele Entwicklungsstufen der B-Zelle. Ein Doppel-knockout von IRF4 und IRF8 resultiert in einem kompletten Arrest der B-Zellentwicklung auf der Stufe der Prä-B-Zelle, die dadurch hyperproliferiert. IRF4, jedoch nicht IRF8 ist maßgeblich an

Rekombinationsprozessen zur Rezeptoreditierung beteiligt und spielt somit eine entscheidende Rolle für die Antikörperproduktion und Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen (70). Für die Enddifferenzierung zu Plasmazellen sind hohe IRF4-Konzentrationen nötig. Dementsprechend fehlen Plasmazellen in IRF4-knockout-Mäusen komplett (70, 71). Zudem werden in diesen Mäusen keine Keimzentren in Lymphknoten und Milz gebildet (62). Neben der B-Zell-Entwicklung sind IRF4 und IRF8 auch maßgeblich an der Entwicklung und Funktion verschiedener T-Zell-Populationen beteiligt (62). IRF4 reguliert z.B. die Th17-Differenzierung. Diese Zellpopulation ist mit einer autoimmunen Enzephalomyelitis assoziiert, die in IRF4-defizienten Mäusen nicht mehr auftritt (72). In regulatorischen T-Zellen wird IRF4 benötigt, um Th2-Immunantworten zu unterdrücken und sie somit zu kontrollieren (73). IRF8-Defizienz geht mit gestörten Th1-Immunantworten, IL-12 Produktion und somit mit verstärkter Infektanfälligkeit einher (59). IRF4 ist für die Entwicklung von CD4(+) dendritische Zellen nötig, die in IRF4-knockout Mäusen fehlen. Die Entwicklung von CD8- (+) DCs wird hingegen über IRF8 reguliert. Für die Entwicklung von CD4(-)CD8 (-) DCs werden beide Faktoren benötigt. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) werden hauptsächlich über IRF8 und nur zu einem geringeren Anteil von IRF4 reguliert (74). Da pDC wichtige IFN-Produzenten sind, wird deutlich, dass IRF8 auch in der antiviralen Abwehr von Bedeutung ist (59). Die Überexpression von IRF4 ist mit verschiedenartigster maligner Entartung des hämatopoetischen Systems assoziiert, wie T- und B-Zell-Lymphomen, Leukämien und dem multiplen Myelom (75). Letzteres entsteht durch eine chromosomale Translokation des IRF4-Gen in die Nähe des Immunglobulin-Schwerketten-Lokus, wodurch es stark vermehrt exprimiert wird. Ähnlich können auch onkogene Viren, wie HTLV-I und EBV über eine verstärkte IRF4-Expression zu Lymphomen führen (62).

IRF6 unterscheidet sich von den meisten IRF-Mitgliedern dadurch, dass es Funktionen außerhalb des Immunsystems hat. Es ist der Hauptregulator in der terminalen Differenzierung von Keratinozyten, die bei IRF6-Gendefekte hyperproliferieren. Dies geht mit Anomalitäten von Haut, Extremitäten und kraniofazialer Morphologie einher. Oftmals ist die IRF6-Defizienz embryonal schon letal (59). Beim Menschen sind IRF6-Genmutationen mit dem Van-der-Woude-Syndrom und dem Popliteal-Pterygium-Syndrom assoziiert (58). Seit kurzem weiß man auch, dass die IRF6-Expression mit der Invasivität von Mammakarzinomen korreliert. IRF6 interagiert mit dem Tumorsuppressorgen Maspin, das proapoptotisch aktiv ist und Zellinvasion inhibiert. Wie Maspin so ist auch der Mangel an IRF6 mit Brustkrebs assoziiert (58).

1.3. Ziel der Untersuchung und Hypothese

In dieser Untersuchung wurde der Fokus auf die angeborene Immunität im Rahmen der renalen IR gelegt. Dabei sollte die regulatorische Rolle von IRF4 in der IR-induzierten sterilen Entzündungsreaktion erforscht werden. Es ist bereits bekannt, dass IRF4 durch LPS induziert wird und die nachfolgende Entzündungsreaktion drosselt (60, 63). LPS sind Bestandteile der Zellmembran Gram-negativer Bakterien, die beim Zerfall der Bakterien freigesetzt werden (Endotoxine). In der experimentellen Forschung simulieren sie also eine bakterielle Infektion. Es ist derzeit unbekannt, ob oxidativer Stress, wie er im Rahmen der IR entsteht, ebenfalls die IRF4-Expression induziert. Dazu wurden Nierengefäße in Mäusen für eine definierte Zeit abgeklemmt und nach einer Reperfusionsphase untersucht. Dabei wurden IRF4-defiziente Mäuse mit Wildtyp-Mäusen verglichen.

Der IR-induzierten Gewebeschaden löst TLR2/MyD88- und TLR4/MyD88-Signalkaskaden aus. TLR2 und TLR4 werden sowohl auf myeloische als auch auf Tubulusepithelzellen exprimiert und werden durch IR hochreguliert. Interessanterweise spielt die TLR2- bzw. TLR4-Signaltransduktion nach renaler IR in den Tubulusepithelzellen eine bedeutendere Rolle als in myeloischen Zellen (28, 29). Da das Netzwerk der intrarenalen DCs aber maßgeblich am *Danger-Signaling* in der Niere beteiligt ist (76), wurde vermutet, dass inhibitorische Faktoren in myeloischen Zellen die TLR-Signaltransduktion beeinflussen. In früheren Experimenten des Labors konnte gezeigt werden, dass SIGIRR die Aktivierung von renalen DCs nach IR unterdrückt (50). SIGIRR ist ein Transmembranrezeptor und wird konstitutiv in intrarenalen DCs exprimiert (77). Es ist anzunehmen, dass neben konstitutiv exprimierten Faktoren auch induzierbare Faktoren die IR-bedingte Entzündungsreaktion kontrollieren. Wir vermuteten, dass IRF4 ein induzierbarer Faktor im Rahmen der IR sein könnte.

Die Hypothese für dieses Experiment wurde wie folgt formuliert:

IRF4 wird durch oxidativen Stress induziert und reduziert die Zytokin/Chemokin-Sekretion intrarenaler DCs und schützt dadurch vor Gewebeschaden und Funktionsverlust der Niere.

Kapitel 2:

Material und Methoden

2. Material und Methoden

Verwendete Geräte und Materialien

BioRad Semi-Dry Blotting System	BioRad, München, Deutschland
ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Entwickler Curix 60	AGFA, Köln, Deutschland
Gel-Elektrophorese-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Gene Amp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Illinois, USA
Homeothermic Blancet, Control Unit	Panlab Bioreserch, Barcelona, Spanien
Lichtmikroskop Leitz Diavert	Leica Microsysteme, Bensheim, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz DMRBE	Leica Microsysteme, Bensheim, Deutschland
Digitale Kamera DC 300F	Leica Microsysteme, Cambridge, UK
LightCycler-480 Real-time qPCR System	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler 480 Multiwell Platte 96 (+ Klebefolie)	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS-Micro-Beads-Magnet	Milteny Biotec, Berg.-Gladbach, Deutschland
Mini-PROTEAN [®] II Electrophoresis Cell	BioRad, München, Deutschland
pH meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Schneidgerät	Jung CM 3000, Leica, Solms, Deutschland
Sonicator	Branson, Danbury, CT, USA
Spektrophotometer Beckman DU [®] 530	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Sicherheitswerkbank, Microflow Klasse-2	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultra TURRAX T25 (Rotor-Stator-Homogenisator)	Ika-Werke, Staufen, Deutschland
UNO-II-Cycler (Thermocycler)	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Licht	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland
Vortex Genie 2 [†]	Scientific Industries, N.Y., USA
Sartorius-Waage BP110S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Wasserbad HI 1210	Leica Microsysteme, Solms, Deutschland
Yasargil Aneurysm Clip	Medicon, Tuttlingen, Deutschland
Yasargil Clip Applying Forceps	Medicon, Tuttlingen, Deutschland
Zellinkubator Type B5060 EC-CO ₂	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	VWR International, Darmstadt, Deutschland

Megafuge 1.0R, Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hettich Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zählkammer-Neubauer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
24-well-Platten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
6-well-Platten	Costar Corning, Schiphol-Rijk, Holland
Einbettkassetten	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
1,5ml-Gefäße (öEppisö)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Falcons 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Immobilon PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland
Kodak BioMax XAR Film	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
MACS LS-Colums	Milteny Biotec, Berg.-Gladbach, Deutschland
Mersilene, Polyester, 2-0	Ethicon, Belgien
Mikropipetten 20µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Multikanalpipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nadeln BD Microlance 26 G x ½	BD, Heidelberg, Deutschland
Nunc-Immuno ¹ 96 Microwell ¹ Plates	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen 1-1 000µl Typ Gilson [®]	Peske, Aindling-Arnhofen, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten Pipetman [®] P	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe Pipetus [®] -classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plastikfilter 70µm	BD, Heidelberg, Deutschland
Preseparationsfilter 30µm, 70µm	Milteny Biotec, Berg.-Gladbach, Deutschland
Skalpelle No. 20	Feather Safety Razor Co., Japan
Spritzen BD Plastipak 1000µl, 5ml, 2ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Sterile Mullkompressen 5x5cm	NOBA Verbandmittel, Wetter, Deutschland
Whatman-Papier	Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland
Zellkulturschalen 10cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber 24cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb, Cell strainer 70µm	BD, Heidelberg, Deutschland

2.1. Tierzucht und Tierhaltung

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
IRF4-/- Mäuse	Mak T.W., Depatement of Biophysics, Universität Toronto

In dieser Studie wurde C57BL/6 Mäuse und IRF4-knockout-Mäuse (IRF4-/-) verwendet. Da die homozygote Zucht der IRF4-defizienten Mäuse erfolglos blieb, wurden sie durchgehend heterozygot gezüchtet. Sie wurden in 10 Generationen in den C57BL/6J-Stamm rückgekreuzt (78). Je fünf Mäuse wurden in Macrolon Typ II L Käfigen mit Filterdeckel gehalten und hatten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter. Käfige, Futter, Wasser, Stroh und Nestwatte wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2. Genotypisierung der Mäuse

Proteinase K (20mg/ml)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP40	Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland
10x-PE-Puffer (Thermopol Puffer)	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
1,25mM dNTP	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland

<i>PBND-Puffer:</i>	2,5ml 2M KCl; 1ml 1M Tris-HCl (pH8,3); 0,25ml 1M MgCl ₂ ; 10ml 0,1% Gelatine; 0,45ml 100% NP-40; 0,45ml 100% Tween-20; auf 100 ml Wasser auffüllen
<i>6x-Ladepuffer:</i>	3000µl 100% Glycerol; 500µl 5% Bromphenolblau; 500µl 5% Xylencyanol; 6000µl Wasser
<i>Low-range-Proteinmarker:</i>	30µl DNA-Ladder, 15µl 6x-Ladepuffer, 60µl Wasser
<i>5x-TBE-Puffer:</i>	53g Tris; 27,5g Borsäure; 20ml 0,5M EDTA [pH8,0]
<i>2%-Agarose-Gel:</i>	2g Agarose; 100ml 1x TBE; 8µl Ethidiumbromid (10 mg/ml); aufkochen

Mastermix für PCR (pro Probe):

2,5µl	10x-PE-Puffer	
2,0µl	1,25mM dNTP	
1,0µl	Forward-Primer (10 pmol)	Metabion, München, Deutschland
1,0µl	Reverse-Primer (10 pmol)	Metabion, München, Deutschland
0,5µl	Taq-DNA-Polymerase	
17,0µl	H ₂ O	

verwendete Primer:

IRF4-WT-Forward-Primer: 5'- GCA ATG GGA AAC TCC GAC AGT -3'
 IRF4-WT-Reverse-Primer: 5'- CAG CGT CCT CCT CAC GAT TGT -3'
 IRF4-KO-Forward-Primer: 5'- CCG GTG CCC TGA ATG AAC TGC 3'
 IRF4-KO - Reverse-Primer: 5'- CAA TAT CAC GGG TAG CCA ACG -3'

Von jeder zu testenden Maus wurde ein 2mm Schwanzstück abgeknipst und in 200µl PBND-Puffer gelegt. Dann wurde 1µl Proteinkinase K (20 mg/ml) dazugegeben. Bei 56° C wurde das Gewebe in vier Stunden im Thermoblock (Eppendorf-Thermomixer, Hamburg, Deutschland) inkubiert und gelegentlich gemischt bis es vollständig aufgelöst war. Anschließend wurden die Proben zwei Minuten bei 13000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und 150µl in ein neues Gefäß pipettiert. Nun stand die isolierte DNA zur weiteren Verarbeitung bereit.

Anschließend wurden zwei verschiedene Mastermixe für die anschließende PCR vorbereitet (s. oben). Für jede Probe ergab sich ein Mastermix-Volumen von 24µl. Die Mixe unterschieden sich in den dazugegebenen Primerpaaren: einer beinhaltete die IRF4-Wildtyp-Primer (WT) und der andere die IRF4-knockout-Primer (KO), jeweils Forward- und Reverse-Primer. Für jede DNA-Probe wurde nun ein WT-Mastermix und ein KO-Mastermix mit 1µl DNA angesetzt. Somit hatte man zwei Mastermix-Reihen mit den gleichen DNA-Proben. Als Kontrollen wurden Proben mit (C57BL/6)-Wildtyp- [+/+], heterozygote IRF4-knockout- [+/-], homozygote IRF4-knockout-DNA [-/-] und mit Wasser (statt mit DNA) angesetzt. Nun konnten die Proben in die PCR-Maschine gestellt werden. In 30 Zyklen wurde die DNA amplifiziert, wobei jeder Zyklus aus 30 Sekunden bei 94°C (Denaturierung), 60 Sekunden bei 61°C (Primer-Hybridisierung) und 90 Sekunden bei 72°C (DNA-Synthese) bestand. Vor dem eigentlichen Beginn der Zyklen war eine Prä-Inkubation von 15 Minuten bei 94°C nötig, um eine optimale Denaturierung der DNA und der Primer zu ermöglichen. Am Ende der 30 Zyklen wurden die Proben weitere 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Durch diese Inkubation wurden die DNA-Einzelstränge wieder optimal hybridisiert. Nach vier Stunden war die PCR fertig und die Proben wurden auf 4°C gekühlt. Dann wurde ein 2%-iges Agarosegel angefertigt. Dazu wurden 2g Agarosepulver (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in 100ml TBE-Puffer angerührt, kurz aufgekocht und schließlich 8µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) beigemischt. Kurz vor dem Auftragen der Proben auf das Agarosegel wurden sie mit 4µl 6x-Ladepuffer gemischt. Davon wurden nun 8-10µl auf das gefestigte Gel aufgetragen. In die erste Vertiefung wurde ein *low-range*-Proteinmarker aufgetragen, in dem sich verschiedene DNA-Fragmente bekannter Längen befanden. Nun wurden die Proben bei 200V 15-32 Minuten laufen gelassen. Durch das Ethidiumbromid konnten die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Der Vergleich der beiden Mastermix-Reihen ermöglicht eine Zuordnung der Mäuse in heterozygote oder homozygote Genotypen in Bezug auf IRF4-Wildtyp bzw. IRF4-knockout.

2.3. Uni- und bilaterale Abklemmung der Nierengefäße

Naloxon Inresa 0,4mg (<i>Naloxonhydrochlorid</i>)	Inresa-Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
Midazolam-ratiopharm 5mg/ml (<i>Midazolamhydrochlorid</i>)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Flumazil Hikma 0,5mg/5ml (<i>Flumazil</i>)	Hikma Pharma, Nieder-Olm, Deutschland
Antisedan (<i>Atipamezolhydrochlorid</i> 5mg/ml)	Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dormitor 1mg/ml (<i>Medetomidinhydrochlorid</i> + <i>Methyl-4-hydrobenzoat</i> + <i>Propyl-4-hydrobenzoat</i>)	Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fentanyl-Janssen 0,1mg (<i>Fentanylcitrat</i>)	Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland

An 6 bis 8 Wochen alten C57-Bl/6-Wildtyp- und IRF4-Knockout-Mäusen wurden bi- und unilaterale Abklemmungen (Yasargil Aneurysm Clip, Medicon, Tuttlingen, Deutschland) der Nierengefäße vorgenommen. Dazu wurden die Mäuse zunächst narkotisiert mit folgender Narkosemischung: 2x 5mg/5ml Midazolam-Ratiopharm, 2ml Fentanyl (0,05mg/ml) und 1ml Dormitor (1mg/ml). Die Narkoseinjektion erfolgte intraperitoneal und die Menge je nach Mausgewicht war zwischen 150µl und 200µl. Unmittelbar nach der Narkotisierung wurden die Mäuse auf ein vorgeheiztes 39°C-warmes Wärmepad gelegt, um einen raschen Abfall der Körpertemperatur zu vermeiden. Desweiteren wurde eine 60-Watt-Infrarot-Wärmelampe benutzt, um die Körpertemperatur während der ganzen Prozedur konstant zwischen 35 und 37°C zu halten. Die Operation erfolgte auf einem separaten Wärmepad. Die Körpertemperatur wurde mittels Thermosonde rektal gemessen und kontrolliert (Homeothermic Blancet, Control Unit und Temperature Probe, Panlab Bioresearch, Barcelona, Spanien). Die Augen der Tiere wurden mit Bepanthen-Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Uni- oder bilateral erfolgte eine 1cm lange Inzision an den Flanken, wobei die Nieren nach der Gefäßabklemmung in der Bauchhöhle gehalten wurden, um Austrocknung und Wärmeverlust zu vermeiden. Die Inzision wurde mit einer NaCl-getränkten sterilen Kompresse während der Ischämiezeit abgedeckt (Abbildung 12). Anschließend wurden die Nierengefäße wieder eröffnet, wobei auf eine sichtbare Reperfusion geachtet wurde. Drei Tropfen physiologische NaCl-Lösung wurde in die Bauchhöhle getropft, um eventuellen Blutverlust auszugleichen. Die Inzision incl. Peritoneum wurde mit zwei Stichen geschlossen (Mersilene, Polyester, 2-0 Ethicon, Belgien). Dann erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 200 µl Anatagonistenlösung folgender Mischung: 5ml Annexate (0,1mg/ml), 0,5ml Antisedan (5mg/ml) und 3ml Naloxon (0,4mg/ml). Nach dem Erwachen wurden die Tiere noch weitere zwei Stunden mit einer Infrarot-Wärmelampe vor Hypothermie geschützt.

Für die unilateralen Versuche wurde eine 45-minütige Ischämiezeit gewählt, da diese Zeitspanne in Vorversuchen die konstantesten Ergebnisse hinsichtlich Gewebeschaden und Entzündungsparameter lieferten. In einer bilateralen Versuchsreihe (n=5), mit ansteigenden Ischämiezeiten (30 ó 45 ó 60 ó 90 Minuten) zeigte sich allerdings, dass 45 Minuten Ischämie zu stark belastet. Nach 45 Minuten bilateraler Gefäßabklemmung entwickelten sich so hohe Kreatininwerte, dass eine Unterscheidung zwischen Wildtyp- und IRF4-Knockout-Mäusen kaum mehr möglich gewesen wäre. Ab 60 Minuten war der Gesamtorganismus zu stark geschädigt, das die wieder fallenden Werte erklären könnte (Abbildung 13). Deshalb wurde für die bilateralen Versuche eine Ischämiezeit von 30 Minuten gewählt.

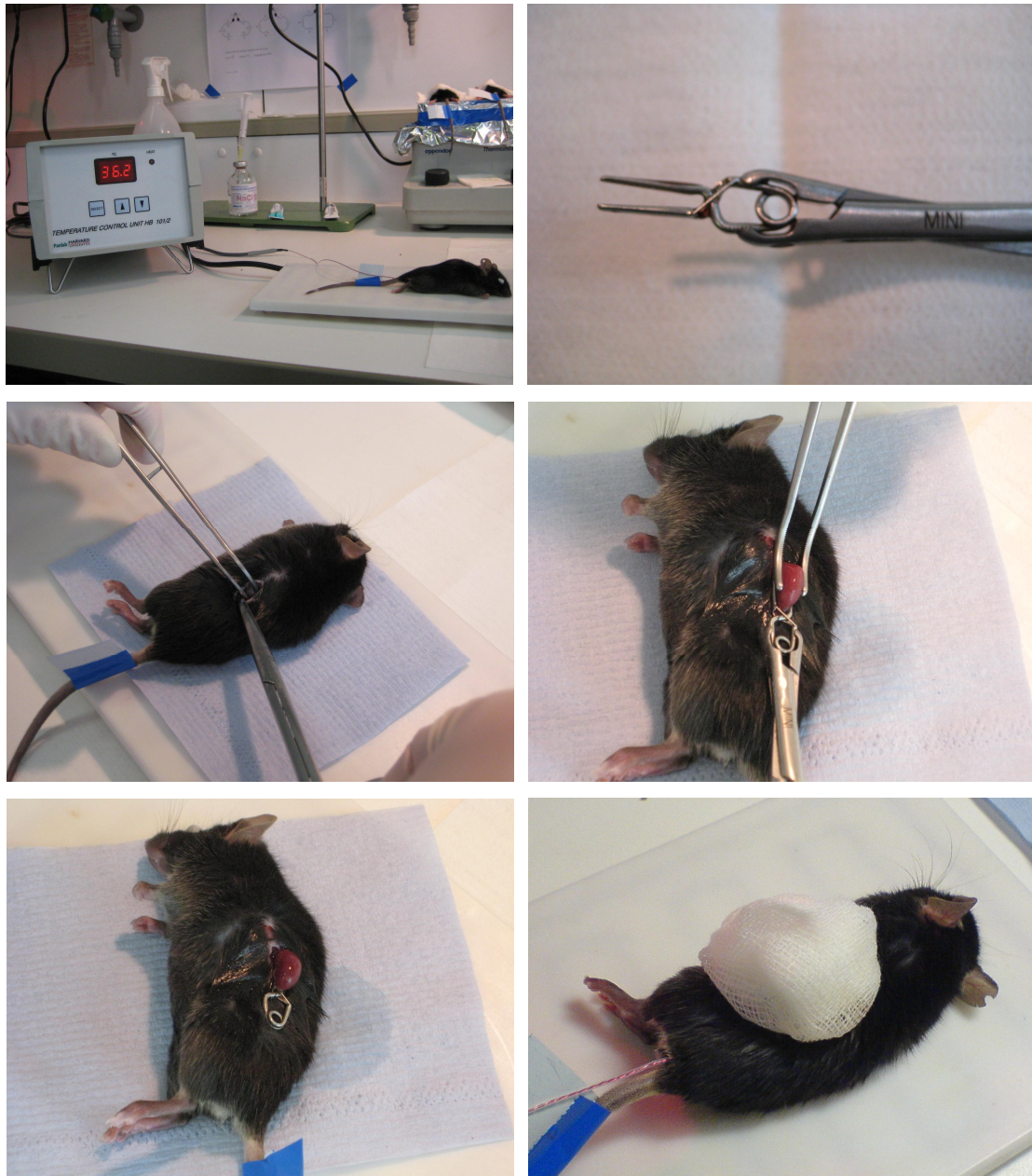


Abbildung 12: Abklemmung der Nierengefäße. Während der ganzen Prozedur wurde die Körpertemperatur gemessen und konstant zwischen 35 und 37° C gehalten. Nach der Narkotisierung erfolgte eine 1 cm lange Inzision an den Flanken. Dann wurden die Nieren vorsichtig, aber zügig nach außen verlagert und die Nierengefäße mit einer Klemme abgeklemmt. Während der Ischämiezeit wurden sie in der Bauchhöhle gehalten und mit einem NaCl-getränkten Tupfer vor Austrocknung geschützt.

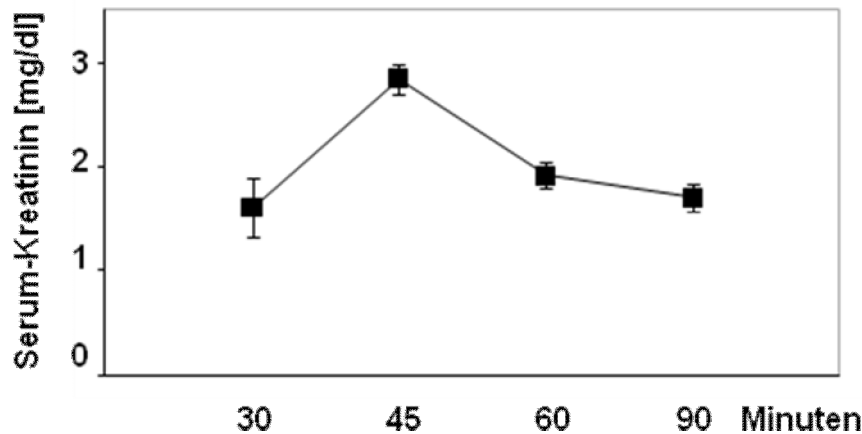


Abbildung 13: Bilaterale Versuchsreihe mit ansteigenden Ischämiezeiten. Gruppen von Mäusen (n=5) wurden einer bilateralen Abklemmung der Nierengefäße mit ansteigenden Ischämiezeiten unterzogen. Nach 24 Stunden Reperfusion wurde Kreatinin im Serum bestimmt (\pm SEM). Ab 45 Minuten Ischämie sind die Mäuse zu stark geschädigt bzw. die Kreatininwerte zu hoch. Die Letalität der Mäuse nimmt zu und eine Unterscheidung zwischen Wildtyp- und IRF4-/- Mäusen ist kaum mehr möglich.

Nierenentnahme nach der unilateralen Operation

Einem Tag, fünf oder zehn Tage nach der unilateralen Operation wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Nach medianer Laparotomie wurden sowohl die Ischämienieren als auch die unbehandelten / *sham*-operierten Kontrollnieren entnommen. Nach zügiger aber sorgfältiger Entfernung der Nierenkapsel, wurden die Nieren in drei Querteile geteilt. Der obere Nierenpol wurde zur weiteren RNA-Bestimmung in 600µl RNeasy Lysis Buffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) eingelegt und auf Eis gehalten bzw. bei -20°C eingefroren. Der mittlere Nierenbereich mit dem Hilus wurde für die histologische Schnittpräparation in 10%-iger Formalinlösung eingelegt. Der untere Nierenpol wurde in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Jede Versuchsgruppe bestand aus 6 Mäusen.

Blutabnahme nach der bilateralen Operation

Nach der bilateralen Gefäßklemmung wurde den Mäusen 24 Stunden postoperativ Blut entnommen und Kreatinin und Harnstoff im Serum bestimmt. Jede Versuchsgruppe bestand aus 6 Mäusen.

2.4. Behandlung der Mäuse vor der Nierengefäßabklemmung

Behandlung der Mäuse mit Clodronat-Liposomen

Cl₂MDP (Clodronat)

Roche, Mannheim, Deutschland

[2,5g / 10ml wässriger Lösung (PBS)]

Clodronat wurde von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) überlassen. Es ist ein nicht-toxisches Bisphosphonat und wird in der Humanmedizin bei osteolytischen Knochenerkrankungen eingesetzt. Da es stark hydrophil ist und somit die Lipiddoppelschicht der Zell- und Liposommembranen nicht passieren kann, wird es in Liposomen verpackt (Abbildung 14). Auf diese Weise kann es durch Endozytose von phagozytotischen Zellen wie Osteoklasten, Makrophagen, DCs etc. aufgenommen werden (Abbildung 15). Durch die Verschmelzung mit Lysosomen wird die Lipiddoppelmembran der Clodronat-Liposomen durch Phospholipasen zerstört. Clodronat wird in der Zelle freigesetzt, kann aber nicht mehr entweichen. Es akkumuliert und bei Überschreiten eines Grenzwertes geht der Phagozyt durch Apoptose zugrunde. Aus zerstörten Zellen freigesetztes Clodronat hat in der Zirkulation nur eine kurze Halbwertszeit von ca. 15 Minuten und wird schnell renal ausgeschieden. Freies Clodronat dringt nicht in Zellen ein (www.clodronateliposomes.org) (79).

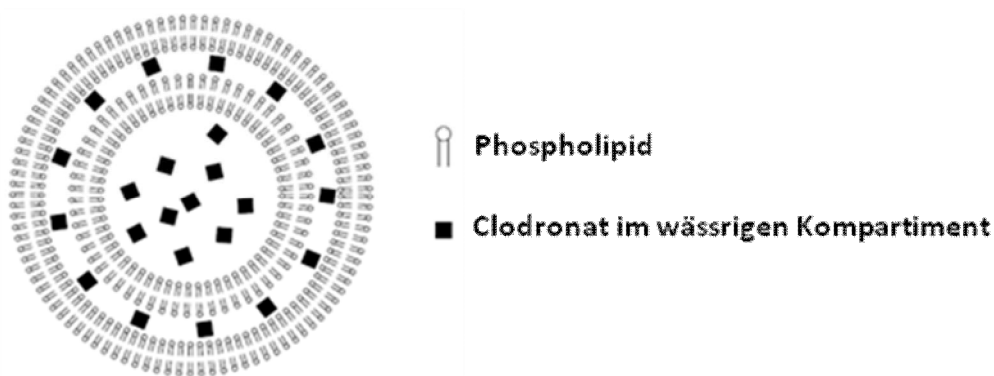


Abbildung 14: Aufbau eines Clodronat-Liposoms. Phospholipide bilden eine Doppelschicht mit den hydrophilen Köpfen nach außen gerichtet. Clodronat befindet sich im wässrigen Kompartiment des Liposoms (www.clodronateliposomes.org).

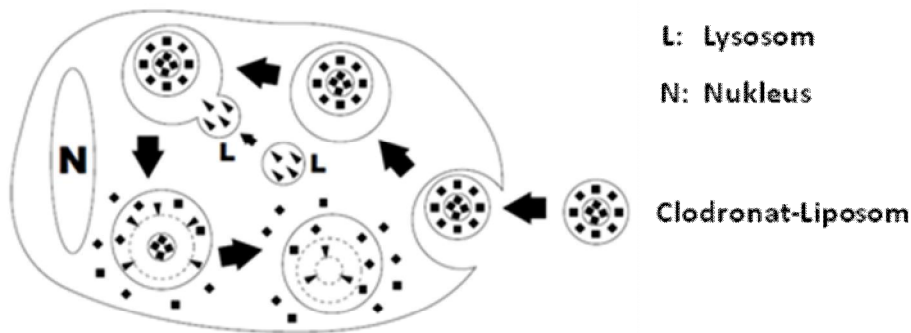


Abbildung 15: Phagozytose eines Clodronat-Liposoms. Nach der Verschmelzung des Clodronat-Liposoms mit einem Lysosom, löst sich die Liposom-Membran auf und Clodronat wird in der Zelle freigesetzt und akkumuliert dort (www.clodronateliposomes.org).

In einer šbilateralenō Versuchsreihe wurden Wildtyp- und IRF4-Knockout-Mäuse mit Clodronat vorbehandelt, um v.a. DCs zu eliminieren. Dazu wurden am Tag -3 und -2 vor der Operation 200μl Clodronat-Liposomen bzw. Kontroll-Liposomen (Roche Diagnostics, Mannheim) intravenös injiziert (47). Nach 24 Stunden Reperfusion wurde Blut entnommen und Kreatinin und Harnstoff im Serum gemessen.

Behandlung der Mäuse mit dem TNF-Inhibitor Etanercept

Etanercept (*Enbrel*®), 50mg/ml Injektionslösung

Wyeth Pharma Madison, Niederlande

Der TNF- -Inhibitor Etanercept (*Enbrel*®) ist ein gentechnologisch hergestelltes Fusionsprotein bestehend aus dem Fc-Teil eines IgG und einer Ligandenbindungsdomäne des humanen TNF-Rezeptor-2. Dieser lösliche TNF- -Rezeptor hat eine vielfach höhere Affinität zu TNF- als der ortsständige Rezeptor auf der Zelle. Dadurch wird TNF- von Etanercept abgefangen, bevor es sein eigentliches Ziel erreicht und seine starke proinflammatorische Wirkung wird gehemmt (Abbildung 16). Um die Rolle des stark proinflammatorischen Zytokins TNF- im Rahmen der IR zu untersuchen, wurden Gruppen von Wildtyp- und IRF4-Knockout-Mäusen mit einer einmaligen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht behandelt. Dafür wurden die Mäuse einer bilateralen Nierengefäßabklemmung unterzogen. Die intraperitoneale Injektion erfolgte unmittelbar nach Eröffnen der Gefäße. 24 Stunden postoperativ wurde Blut entnommen und Kreatinin und Harnstoff im Serum gemessen.



Abbildung 16: Löslicher und gebundener TNF- -Rezeptor. Der lösliche TNF- -Rezeptor hat eine vielfach höhere Affinität zu TNF- und fängt es ab, bevor es an sein eigentliches Ziel binden kann (www.enbrel.de).

Behandlung der Mäuse mit dem Antioxidans MnTMPyP

MnTMPyP

Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland

(*Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin*)

Das Antioxidans MnTMPyP katalysiert die Dismutation von O_2^{\cdot} und fängt auf diese Weise Sauerstoffradikale ab, die u.a. vermehrt im Rahmen der IR entstehen. Um zu untersuchen inwieweit Sauerstoffradikale für die IRF4-Induktion relevant sind, wurden Wildtyp-Mäuse vor, während und nach der unilateralen Abklemmung der Nierengefäße mit MnTMPyP behandelt. Dafür wurden jeweils 5mg/kg Körpergewicht 12 Stunden vor, während und 12 Stunden nach der Operation intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Ischämie- und die *sham*-operierten Kontrollnieren 24 Stunden postoperativ entnommen und Zellpopulationen mit der *Micro-Bead*-Technik im Magnetfeld isoliert und weiter untersucht.

2.5. Blutentnahme und Kreatinin- und Harnstoffmessung im Serum

Isofluran

Abbott, Wiesbaden, Deutschland

Die Mäuse wurden zunächst mit Isofluran-Gas narkotisiert. Dann erfolgte die Blutentnahme mit einer 20µl-Mikropipette über die V. angularis im medialen Augenwinkel. Um Serum zu gewinnen, wurden die Blutproben 4 Stunden bei 4°C gelagert und anschließend 5 Minuten bei 6000 Umdrehungen/Minute kühl zentrifugiert und in ein neues Gefäß pipettiert. Für die Kreatinin- und Harnstoffmessung wurde mindestens 200µl Serum benötigt. Die Proben wurden kühl gelagert in das Labor *šSynlab.vetö* nach Augsburg verschickt (www.synlab.de).

2.6 RNA-Gewinnung und Umschreiben in cDNA

2.6.1. RNA-Isolation aus Nierengewebe

0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
15g/ml lineares Acrylamide	Ambion, Darmstadt, Deutschland
100mM dNTP Set	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
25mM dNTPS	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
40 U/l rRNasin	Promega, Mannheim, Deutschland
5*First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
(enthält DNase, RDD-Puffer und RNase freies Wasser)	
Hexanucleotide	Roche, Mannheim, Deutschland
RNA-sample-loading-Buffer (incl. Ehtidiumbromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Superscript II (reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase-freies Wasser	

5x-TBE-Puffer: 53g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml von 0,5M EDTA [pH8,0]

2%-Agarose-Gel: 2 g Agarose-Pulver + 100 ml 1xTBE-Puffer

1 g Agarose-Pulver + 50 ml 1xTBE-Puffer

Zur RNA-Gewinnung wurde das RNeasy-Kit von Qiagen verwendet. Es wurde an einem RNase-freien Arbeitsplatz auf Eis gearbeitet. Alle Eppendorf-Röhrchen wurden vorher mit DEPC behandelt.

Die Nierenstücke waren in 600µl RNAlater eingelegt und bei -20°C gelagert. Zunächst wurden 30mg Nierengewebe für die RNA-Isolation abgewogen (Sartorius-Waage BP110S, Sartorius AG), mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und sofort in RLT-Lyse-Puffer gelegt (mit 1 % β-

Mercaptoethanol gemischt). Anschließend wurde das Gewebe mit dem Ultra-TURRAX-T25-Homogenisator (Ika-Werke, Staufen, Deutschland) lysiert und homogenisiert (30 Sekunden). Dem RNeasy-Mini-Kit-Protokoll folgend wurde das Lysat zentrifugiert (3,5 Minuten bei 13200 Umdrehungen/Minuten), in ein neues Gefäß pipettiert, im Verhältnis 1:1 mit 70% nicht vergälltem Ethanol gemischt und auf die RNeasy-Mini-Säulen pipettiert. Dann wurde wieder zentrifugiert (15 Sekunden bei 10000 Umdrehungen/Minute). In der Membran der Säule wird die freigesetzte RNA aufgefangen. Mit 350µl RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation (15 Sekunden bei 10000 Umdrehungen/Minute) wurde der Alkohol ausgewaschen. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNase-free-DNA-Sets (Qiagen, Hilden, Deutschland) von möglicher DNA-Kontamination gereinigt. Dazu musste zunächst das DNase-Pulver mit 550µl RNase-freiem Wasser aufgelöst werden (DNase-1-Stammlöschung). Eine Mischung aus 10µl DNase-1-Stammlöschung mit 70µl RDD-Puffer wurde mittig auf die RNA-enthaltende Mini-Säule gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten zwei weitere Waschschrte mit je 500µl RPE-Puffer (gemischt mit 100% nicht vergälltem Ethanol im Verhältnis 1:4) und Zentrifugation (15 Sekunden und 2 Minuten bei 10000 Umdrehungen/Minuten). Eine weiterer Zentrifugationsschritt (1 Minute bei 13200 Umdrehungen/Minute) diente der vollständigen Befreiung von Ethanol. Der Durchfluss wurde immer verworfen. Schließlich wurde die RNA mit 30µl RNase-freiem Wasser in ein neues steriles Gefäß diluiert und konnte so bei -20°C gelagert werden

Messen der optischen Dichte und Berechnung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe der optischen Dichte ermittelt (Spektrophotometer DU[®] 530, Beckman, Krefeld, Deutschland). Dafür wurde die RNA im Verhältnis 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt (1µl RNA und 98µl Wasser) und diese 100µl in die dazugehörige Küvette pipettiert und gemessen. Vor der Messung der RNA-Mischungen wurde mit reinem RNase-freiem Wasser auf den Nullwert geeicht. Dafür wurde der Photometer auf die Werte 260nm, 280nm und das Verhältnis der beiden eingestellt. Das 260/280-Verhältnis gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der RNA. Werte zwischen 1,7 und 2,2 sind verwertbar. Werte, die darüber liegen zeigen eine DNA-Kontamination und Werte darunter eine Protein-Kontamination an.

Die RNA-Konzentration wird wie folgt berechnet: $c(\mu\text{g/ml}) = \text{Extension bei 260nm} * \text{Verdünnungsfaktor} * 1 \text{ optische Dichte (für RNA } 40 \mu\text{g/ml})$.

Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese ist eine weitere Möglichkeit die Reinheit der RNA zu ermitteln. Dafür wurden 2µl Probe mit 5µl RNA-Ladepuffer (enthält Ethidiumbromid) gemischt und 10 Minuten bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde es auf 2%-iges Agarose-Gel aufgetragen und 20 Minuten bei 130V laufen gelassen. In der Dunkelkammer wurden die Banden mit UV-Licht fotografiert. Sind die Banden deutlich zu sehen und nicht verwischt, ist der Reinheitsgrad akzeptabel.

2.6.2. Umschreibung der mRNA in cDNA

Eingefrorene RNA-Proben wurden aufgetaut und auf Eis gelagert. Es wurde an einem RNase-freien Arbeitsplatz gearbeitet.

Für die Herstellung von cDNA aus mRNA wurden zwei verschiedene Mastermixe hergestellt: der RT(+)-Mix mit reverse Transkriptase und der RT(-)-Mix ohne reverse Transkriptase. Für jede Probe wurden 4,5µl First-Strand-Buffer, 1µl 0,1M DTT, 0,4µl 25mM dNTPs, 0,25µl Acrylamid (15µg/ml), 0,25µl Hexanukleotide (Primer) und 8µl RNase-freies Wasser gemischt. Kurz vor der Auftragung in die Reaktionsgefäße wurde in den RT(+)-Mix zusätzlich (pro Probe) 0,5µl RNasin und 0,5µl reverse Transkriptase (Superscript II) gemischt; dies wurde für den RT(-)-Mix durch RNase-freies Wasser ersetzt. Die RNA wurde auf 1µg/5µl Wasser verdünnt und zunächst 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Dies diente der vollständigen Entfaltung der RNA und der besseren Reaktion mit der reversen Transkriptase. Nachdem die RNA-Proben kurz auf Eis gekühlt wurden, wurde ihr 15µl Mastermix beigefügt. Dabei wurden wie oben erwähnt von jeder RNA-Probe zwei Mastermix-Reihen hergestellt: eine mit und eine Kontrollreihe ohne reverse Transkriptase. Man erwartet in der RT(-)-Mischung keine cDNA und kann so kontrollieren, ob DNA-Kontaminationen vorhanden sind. Anschließend wurde die ganze Mischung 90 Minuten bei 42°C inkubiert, in der die eigentliche Reaktion abläuft. Diese wurde am Ende durch eine 5-minütige Inkubation bei 85°C gestoppt. Bis zur weiteren Verwendung der cDNA wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

2.7 Real-Time qPCR (LightCycler 480)

Die qPCR ist eine Methode, um spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Anhand dessen lassen sich auch kleinste Mengen von DNA nachweisen. Die Grundprinzipien sind relativ einfach. Die vorhandene DNA-Matrize wird durch Erhitzen (ca. 95°C) denaturiert, d.h. der Doppelstrang wird in zwei Einzelstränge getrennt, um die Replikation zu ermöglichen. Es werden zwei verschiedene Primer (für jeden Komplementär-Strang einen) benötigt, die zusammen die zu vermehrende DNA-Sequenz zwischen sich einschließen (Abbildung 17).



Abbildung 17: Denaturierung der DNA-Stränge und Annealing der Primer. Durch Erhitzen wird die Doppelstrang-DNA in zwei Einzelstränge geteilt, so dass sich die Primer anlagern können. Das Primer-Paar schließt die zu amplifizierende DNA-Sequenz zwischen sich ein.

Primer sind synthetische Oligodesoxyribonukleotide, also kleine DNA-Sequenzen, die komplementär zu einer Sequenz ihrer DNA-Matrize sind. An ihrem 3'-OH-Ende setzt die DNA-Polymerase für die Replikation an. Nach der Denaturierung der DNA lagern sich die Primer an (Annealing). Da die Annealing-Temperatur von der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer abhängt, müssen für jedes Primerpaar die Bedingungen optimiert werden. Sie liegt in etwa zwischen 45 und 65°C. Anschließend wird der Primer durch Anlagerung der passenden dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) mit Hilfe der DNA-Polymerase verlängert (Abbildung 18). Die Taq-Polymerase wurde ursprünglich aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert, von dem sie ihren Namen erhielt. Sie ist besonders hitzestabil und hält den hohen Temperaturen der Denaturierungsphase stand. Somit muss man sie nur zu Beginn einmalig dazugeben.

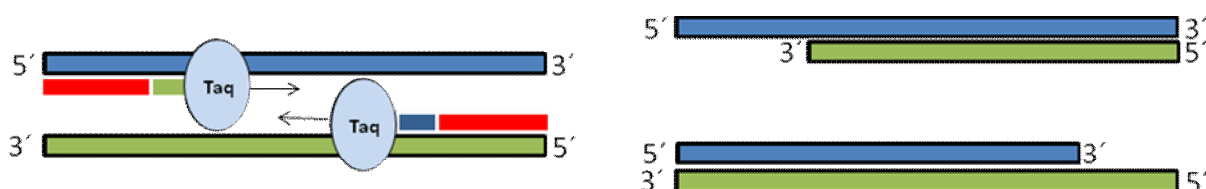


Abbildung 18: DNA-Synthese. Die DNA-Taq-Polymerase verlängert die Primer an ihrem 3'-Ende. Mit jedem Zyklus wird die DNA verdoppelt.

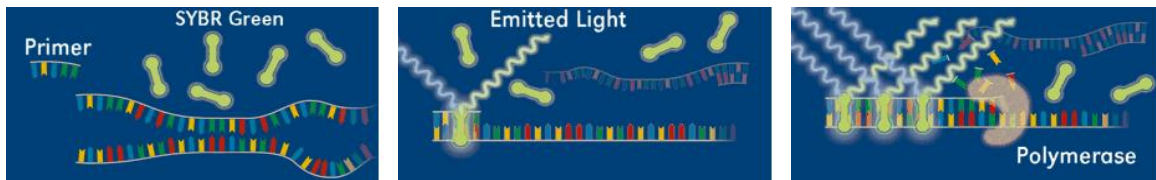


Abbildung 19: SYBR-Green-Farbstoff lagert sich an Doppelstrang-DNA an. Ungebundener Farbstoff fluoresziert nur gering. Nach Anlagerung an Doppelstrang-DNA steigt die Fluoreszenz deutlich an und kann gemessen werden. Mit zunehmender DNA-Menge steigt die Intensität der Lichtemission an (<http://www.genequantification.de/chemistry.html>).

Da ihre optimale Aktivitätstemperatur bei 72°C liegt, synthetisiert sie erst, nachdem die Primer richtig angelagert sind. Üblicherweise umfasst die PCR 20 bis 40 Zyklen. Im SYBR-Green-System wird ein Fluoreszenz-Farbstoff zugegeben, der sich an Doppelstrang-DNA anlagert. Ungebunden fluoresziert der Farbstoff nur gering. Erst durch die Bindung an die DNA steigt die Lichtemission deutlich an, die am Ende jedes Zyklus gemessen wird (Abbildung 19). Im Laufe der PCR nimmt die DNA-Menge zu und proportional dazu steigt schließlich auch die Intensität der Lichtemission. Da sich bei jedem Zyklus die DNA verdoppelt, ergibt sich die endgültige DNA-Menge aus der Ausgangsmenge bzw. aus der ursprünglich vorhandenen mRNA-Konzentration des entsprechenden Gens. Der Farbstoff zeigt ein Hintergrundrauschen (C_t -Wert), da er ungebunden *gering* fluoresziert. Dieser C_t -Wert wird während der Analyse von der gemessenen Intensität subtrahiert.

Protokoll

2x-SYBRGreen-Mastermix (10ml):

2ml 10x-Taq-Puffer ohne Detergenzien	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
150µl dNTPs (25 mM)	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
4ml PCR-Optimizer	Bitop AG, Witten, Deutschland
200µl BSA PCR grade (20 mg/ml)	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
40µl SYBRgreen I (1:100; 20% DMSO)	Fluka / Sigma-Aldrich, München, D.
2,4ml MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
1,21ml RNase-freies Wasser	

PCR-Mix pro Vertiefung:

10µl 2x-SyBrGreen-Mastermix	
0,6µl Reverse-Primer (300 nM)	Metabion, Martinsried, Deutschland
0,6µl Forward-Primer (300 nM)	Metabion, Martinsried, Deutschland
0,16µl Taq-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt, D.
8,4µl RNase-freies Wasser	

0,2µl šcDNA: RT(+), RT(-) oder RNase-freies Wasser (NTC)

verwendete Primer:

IRF4:	Forward-Primer: 5'-CAAAGCACAGAGTCACCTGG-3'
	Reverse-Primer: 5'-TGCAAGCTCTTTGACACACA-3'
IRF5:	Forward-Primer: 5'-ATGGGGACAACACCATCTTC-3'
	Reverse-Primer: 5'-CAGGTTGGCCTTCCACTTC-3'
CCL2/MCP1:	Forward-Primer: 5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3'
	Reverse-Primer: 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
CXCL2/MIP2:	Forward-Primer: 5'-CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG-3'
	Reverse-Primer: 5'-TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC-3'
IL6:	Forward-Primer: 5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'
	Reverse-Primer: 5'-ACCAGAGGAAATTTTCAATAGG-3'
TNF- :	Forward-Primer: 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'
	Reverse-Primer: 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'
18s-rRNA:	Forward-Primer: 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3'
	Reverse-Primer: 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

Die quantitative RT-PCR wurde mit Hilfe des LightCycler 480 und dem SYBR-Green-Detektions-Systems durchgeführt. Dabei wurden alle technischen Schritte nach den MIQE-Richtlinien durchgeführt (80). Zu Beginn wurde ein 2x-Mastermix (s. oben) in ausreichender Menge vorbereitet, der ggf. in Aliquots eingefroren (-20°C) werden konnte. Anschließend wurde der eigentliche PCR-Mix (20µl pro Vertiefung) für die Gen-Amplifikation hergestellt (s. oben), wobei für jedes Gen spezifische Primer (Metabion, Martinsried, Deutschland) verwendet wurden. Als Referenz-Gen wurde die 18s-rRNA getestet. Die Spezifität der Primer wurde in *BLAST* getestet

(www.ensembl.org). Die RT(+)-Proben wurden in Duplikaten, die RT(-)-Proben und die NTC-Proben (Negativkontrolle mit Wasser) wurden in Unikaten aufgetragen. Mit den RT(-)-Proben und den NTC-Proben wurde auf unspezifische DNA-Amplifikation und somit auf die Verwertbarkeit des Tests überprüft. Die Platte wurde nun mit einer Folie fest verschlossen und in den LightCycler-480 gestellt. Die PCR einer Platte dauerte 1 Stunde und 15 Minuten. Vor dem eigentlichen Beginn der Zyklen war eine Prä-Inkubation von 5 Minuten bei 95°C nötig (Initialisierung), um eine optimale Denaturierung von DNA und Primer zu erreichen und um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Dabei fand keine Messung statt. Nach der Prä-Inkubation wurden die Proben auf 60°C (45 Sekunden) gekühlt und die Primer konnten sich anlagern. Anschließend wurden die Proben langsam wieder auf 95°C (15 Sekunden) erhitzt. Während der Erhitzung wurde die DNA amplifiziert und bei 95°C wurde die Doppelstrang-DNA wieder denaturiert und ein neuer Zyklus konnte beginnen. Die DNA wurde in 40 Zyklen vervielfältigt, wobei pro Zyklus eine Messung bei 60°C stattfand (Echtzeit-Messung). Im Anschluss an die 40 PCR-Zyklen erfolgt die Schmelzkurve (melting curve), mit der die Schmelzeigenschaft der Primer geprüft wurden. Dabei wurden die Proben zunächst für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, anschließend auf 65°C runter gekühlt und dann langsam kontinuierlich wieder auf 95°C erhitzt (Abbildung 20). Hier erfolgte eine konstante Messung, wobei nur ein Peak entstehen darf. Am Ende wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Vor der Auswertung wurden zunächst die (RT-)-, die NTC-Werte und das Schmelzkurenprofil jeder einzelnen Probe beurteilt, um unspezifische DNA-Produkte oder Primer-Dimere zu detektieren. Alle Proben, die bis zum 35. Zyklus das Hintergrundrauschen des Farbstoffs nicht überschritten, wurden als nicht analysiert betrachtet und aus der Wertung genommen. Schließlich wurden die Mittelwerte der 18s-rRNA-Werte von den Gen-Werten der anderen Proben subtrahiert (Wildtyp- und Knockout-Werte getrennt). Schließlich wurden die Ergebnisse der Wildtyp- und IRF4-knockout-Tiere in Grafiken miteinander verglichen.

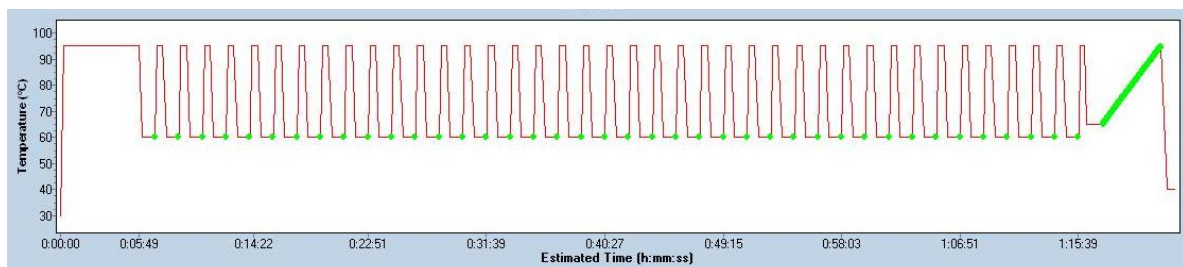


Abbildung 20: Darstellung der PCR-Phasen. Auf der Ordinate ist die Temperatur und auf der Abszisse ist die benötigte Zeit dargestellt. Die PCR wird mit einer Prä-Inkubation bei 95°C gestartet, gefolgt von 40 Zyklen von abwechselnd 60°C und 95°C, in denen die DNA amplifiziert wird. Am Ende wird mit der Schmelzkurve die Schmelzeigenschaft der Primer geprüft. Am Ende jedes Zyklus und kontinuierlich während der Schmelzkurve zeigen grüne Markierungen die Messzeitpunkte an.

2.8 Periodic Acid Schiff-(PAS)-Färbung

Um die Tubulusschäden zu ermitteln, wurden histologische Schnitte der Nieren mit der *Periodic Acid Schiff*-(PAS)-Methode gefärbt (52). Mit dieser histochemischen Technik lassen sich Muko- Polysaccharide, Muko- u. Glukoproteine, Gluko- u. Phospholipide nachweisen, indem Glykolgruppen mit der Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden (Abbildung 21). Anschließend bilden die Aldehydgruppen mit der fuchsinschwefligen Säure (Schiff'sches Reagenz) einen roten Farbstoff (www.tk.de/rochelexikon/). Zu den PAS-positiven Geweben gehören u.a. das renale Tubulussystem (www.stainsfile.info/StainsFile/stain/schiff/reaction-pas.htm).

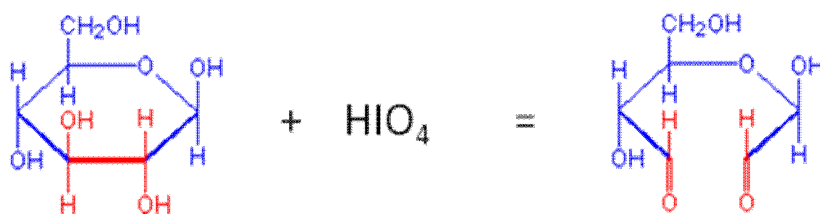


Abbildung 21: Oxidation einer Glykolgruppe zu einer Aldehydgruppe mit Hilfe der Perjodsäure
(www.stainsfile.info/StainsFile/stain/schiff/reaction-pas.htm).

Protokoll

Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
PAS	Bio-Optica, Milan, Italien
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Anfertigen der Paraffinschnitte

Für die histologische Schnittpräparation wurden die mittleren Nierenabschnitte verwendet. Zunächst wurden sie in Histokassetten (neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland) für 24 Stunden in 10%-iger Formalinlösung eingelegt, anschließend in Paraffin eingebettet und 2µm dicke Schnitte angefertigt. Sie wurden auf APS-behandelte Objektträger aufgetragen und 12 Stunden im Trockenschrank bei 37°C inkubiert. Nun wurden sie wie folgt durch die Inkubation in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert: 3x 5 Minuten Xylol, 3x 3 Minuten 100% Ethanol, 2x 3 Minuten 95% Ethanol, 1x 3 Minuten 70% Ethanol. Anschließend wurde 2x 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

PAS-Färbung

Nun erfolgte die eigentliche Färbung. Dazu wurden die Schnitte zuerst 5 Minuten in der Perjodsäure (2% in destilliertem Wasser) inkubiert und 1x 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden sie in der fuchsin-schwefligen Säure (Schiff'sches Reagenz) für 20 Minuten inkubiert und wieder gewaschen. Letztlich wurden sie noch in Hämatoxylin gegengefärbt (2 Minuten Inkubation) und wieder gewaschen. Am Ende wurden sie kurz in 90% Alkohol getaucht, getrocknet und mit einem Deckglas versehen.

Histologische Evaluation der Tubulusschäden

Nun konnten die PAS-Schnitte unter dem Lichtmikroskop (Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) auf Tubulusschäden hin untersucht werden (100-fache Vergrößerung). Da die ischämiebedingten Schäden hauptsächlich im S3-Segment des proximalen Tubulus am kortikomedullären Übergang entstehen, wurde nur dieser Abschnitt evaluiert (Abbildung 22). Dabei wurde der prozentuale Anteil folgender Faktoren abgeschätzt: Zellnekrosen, Verlust des Bürstensaums, Zylinderformationen und Dilatation der Tubuluslumen. Anschließend wurde den Prozentwerten Score-Punkte zugeordnet und in Grafiken dargestellt. Dafür wurde folgender Score entwickelt: 0: keine Schäden; 1: $\leq 10\%$ Schäden; 2: 11-25% Schäden; 3: 26-45% Schäden; 4: 46-75% Schäden; 5: $> 76\%$ Schäden

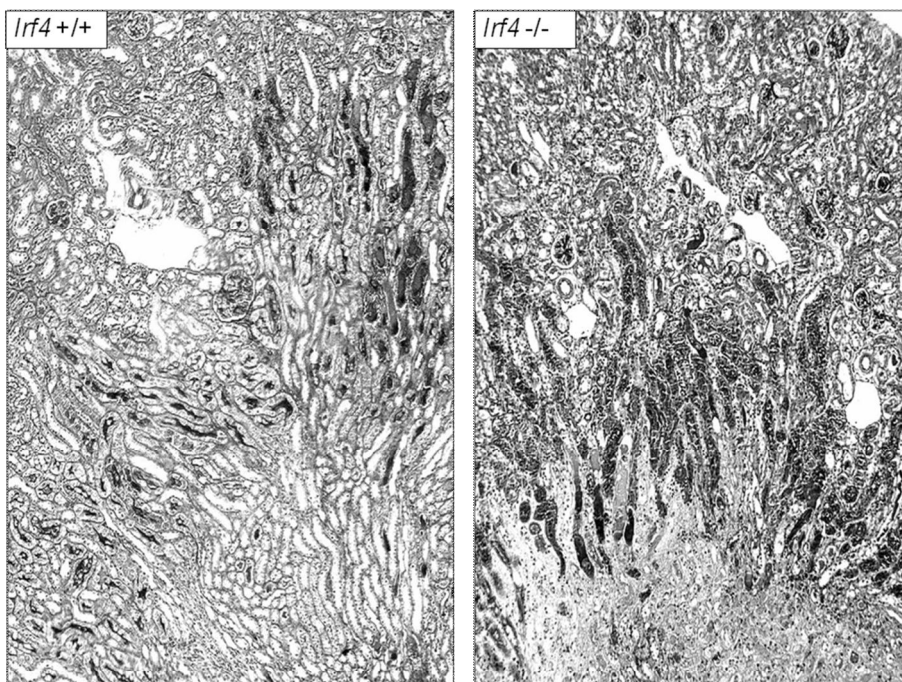


Abbildung 22: PAS-Färbungen der Niere am kortikomedullären Übergang. Unter dem Mikroskop wurde der prozentuale Anteil folgende Faktoren evaluiert: Nekrosen, Verlust des Bürstensaums, Tubulusdilatationen und Zylinderformationen. 100x Vergrößerung

2.9 Immunhistochemie: Neutrophile, Makrophagen und T-Zellen

ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, CA, USA
Methylgrün-Färbelösung	Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Mounting Medium Vecta Mount	Vector, Burlingame, CA, USA
Avidin	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotin	Vector, Burlingame, CA, USA
biotinierter Sekundär-Antikörper	Vector, Burlingame, CA, USA

verwendete Primär-Antikörper:

rat anti-mouse F4/80-Antikörper (1:100)	Serotec, Oxford, U.K.
rat anti-mouse Neutrophile-Antikörper (1:400)	Serotec, Oxford, U.K.
rat anti-human CD3-Antikörper (1:100)	Serotec, Oxford, U.K.

H₂O₂-Methanol-Mix: 30% H₂O₂ in Methanol

Antigen-Demaskierungslösung: 3ml *unmasking-solution* + 300ml destilliertes Wasser

Vorbereiten der Schnitte

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Nierenstücke ebenfalls für 24 Stunden in 10%-iger Formalinlösung eingelegt, in Paraffinblöcke eingebettet, 2µm dicke Schnitte angefertigt und durch Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%) entparaffinisiert, wie im Abschnitt *§PAS-Färbung* ausführlich beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten in 20ml H₂O₂-Methanol-Mix im Dunkeln inkubiert, gefolgt von 2 Waschschritten mit PBS (2x 5 Minuten). Dadurch wird die endogene Peroxidase blockiert. Nun wurden sie in Antigen-Demaskierungslösung eingelegt und 10 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Alle 2,5 Minuten wurde der Flüssigkeitsstand überprüft und ggf. auf das Ausgangsniveau aufgefüllt. Nach dem Kochen wurden sie in 20 Minuten auf Raumtemperatur gekühlt und mit PBS gewaschen. Schließlich wurde endogenes Biotin wie folgt geblockt: zunächst wurden die Schnitte für 15 Minuten in einem Tropfen Avidin inkubiert, gefolgt von einer weiteren 15-minütigen Inkubation mit Biotin.

Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper

Nun konnten die Schnitte mit verschiedenen Primär-Antikörpern inkubiert werden. Je nach Antikörper erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. Danach erfolgte die Färbung mit biotiniliertem Sekundär-Antikörper (1:300 in PBS) für 30 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für weitere 30 Minuten in ABC-Substrat-Lösung (Vektor) bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Zum Schluss wurden sie mit Methylgrün (Fluka) gefärbt. Zwischen den einzelnen Inkubationschritten und Färbungen wurden die Schnitte jeweils 2x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Letztlich wurden die sie mit 96%-igem Alkohol gewaschen, um überschüssige Farbe und Xylen zu entfernen, getrocknet und mit VectaMount (Vektor) befestigt (81).

Histologische Evaluation der Zellen

Die Neutrophilen und die T-Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) mit einer 400-fachen Vergrößerung manuell ausgezählt. Dafür wurden pro Schnitt 10 Gesichtsfelder mit der höchsten Zelldichte, sog. High-Power-Fields (hpf) ausgewählt, gezählt und gemittelt.

Die Makrophagen wurden ebenfalls unter dem Mikroskop mit Hilfe des Computerprogramms *Leica QWin* ermittelt. Dabei wurden die antikörpermarkierten Makrophagen farblich angezeigt und der prozentuale Anteil im Verhältnis zur Gesamtfläche des Gesichtsfelds errechnet. Pro Schnitt wurden ebenfalls 10 Gesichtsfelder in einer 100-fachen Vergrößerung gemessen und anschließend gemittelt.

2.10 Western Blot

Unter *Blotting* versteht man die Übertragung von DNA (Southern Blot), RNA (Northern Blot) und Proteine (Western Blot) von einem Elektrophorese-Gel auf eine Trägermembran, um dann im Anschluss bestimmte Moleküle nachzuweisen. Edwin Southern ist der Erfinder der Blotting-Technik. Er hat 1975 die Methode ursprünglich für die Auftrennung und den Nachweis von DNA entwickelt und ihr den Namen *Southern Blot* gegeben. Erst später wurde die Technik weiter entwickelt, so dass auch RNA und Proteine mit der Blotting-Technik nachgewiesen werden konnten. Der Western Blot wird auch Immunblot genannt, weil die Proteinidentifizierung oft mit Hilfe von Antikörpern erfolgt.

SDS-PAGE

Vor dem eigentlichen Western Blot wird zunächst ein Proteingemisch mit der SDS-PAGE, eine Variante der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Tensid und überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass sie eine konstante negative Ladungsverteilung haben. Desweiteren werden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine u.a. durch Erhitzen oder Zugabe von β -Mercaptoethanol aufgebrochen, so dass sie am Ende eine ellipsoide Form aufweisen. So wird erreicht, dass die negativ geladenen Proteine letztlich nur entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Polyacrylamid-Gel wirkt dabei wie ein Sieb: kleine Proteine wandern leicht durch das Gel und sind schneller, während große Proteine eher zurück gehalten werden.

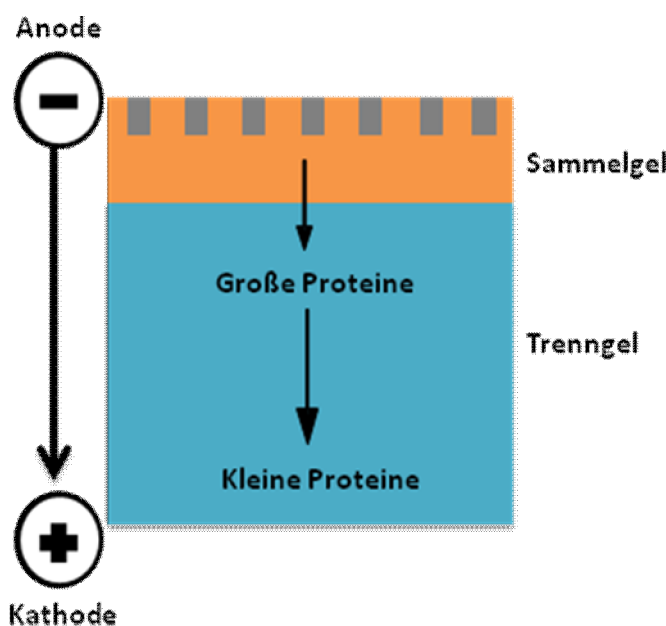


Abbildung 23: Schematischer Aufbau einer diskontinuierlichen Gel-Elektrophorese. In den Vertiefungen werden die Proteinproben aufgetragen. Im Sammelgel (oben) werden sie zuerst aufkonzentriert und im Trenngel (unten) erfolgt dann die eigentliche Auftrennung. Die negativ geladenen Proteine wandern von der Anode in Richtung der Kathode, wobei kleiner Proteine die Poren des Polyacrylamidgels schneller durchlaufen als größere.

Zusätzlich zu den Proben wird ein Größenmarker auf das Gel aufgetragen, anhand dessen die Proteingrößen bestimmt werden können. Dieser besteht aus Proteine bekannter Größe. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wandern die Proteine zuerst in einem Sammelgel, indem sie aufkonzentriert werden. Anschließend wandern sie im Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt (Abbildung 23). Die Gele unterscheiden sich durch unterschiedliche Porengrößen und pH-Werten. Durch diese Technik, die von Ulrich Laemmli entwickelt wurde, können die Proteine besonders gut aufgetrennt werden (82).

Blotting

Für den eigentlichen Blot wird das Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf die Trägermembran gelegt, auf die sie übertragen werden sollen. Unter- und oberhalb liegen mehrere Lagen in Puffer getränkten Papiers. Nun wird senkrecht dazu ein gerichtetes elektrisches Feld angelegt und die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der Kathode auf die Trägermembran (Abbildung 24). Das Muster der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine bleibt auf diese Weise erhalten. Nun können gesuchte Proteine mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden.

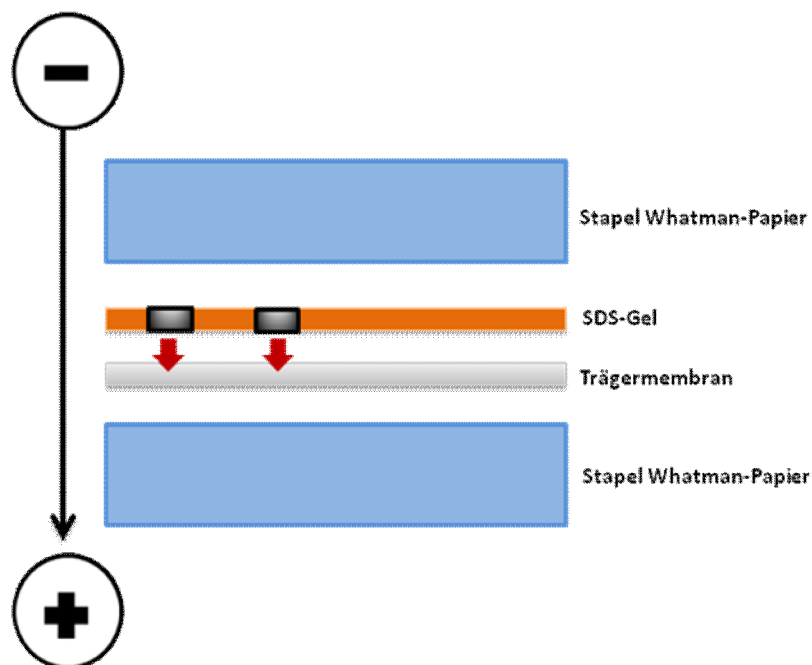


Abbildung 24: Sandwich-Aufbau des Western Blot. Oben und unten befinden sich in Puffer getränkte Papier-Stapel. Dazwischen liegt das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf der Trägermembran. Durch das elektrische Feld wandern die Proteine (in Richtung der Kathode) auf die Trägermembran.

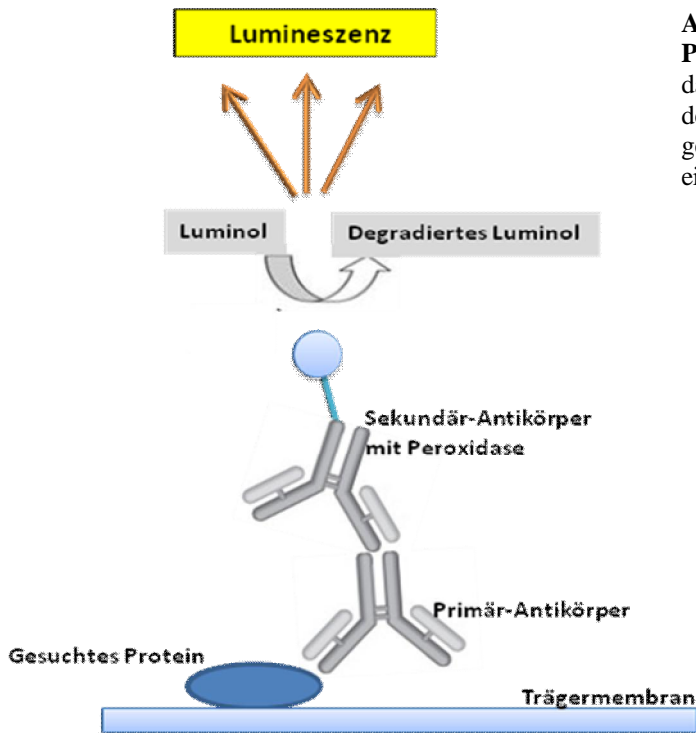


Abbildung 25: Immundetektion der gesuchten Proteine. Der spezifische Primär-Antikörper bindet an das gesuchte Protein. An dessen F_c-Regionen bindet der Sekundär-Antikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt ist. Diese oxidiert Luminol und bewirkt so eine Lumineszenz.

Immundetektion

Nach dem Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip binden spezifische Primär-Antikörper an Epitope der gesuchten Proteine. An die F_c-Regionen der Primär-Antikörper binden anschließend sekundäre Markierungs-Antikörper. Darüber erfolgt dann die eigentliche Detektion. An den Sekundär-Antikörpern ist eine Peroxidase gekoppelt, die eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert (Abbildung 25). In diesem Fall wird Luminol oxidiert. Anschließend wird die Lumineszenz mit einem Röntgenfilm detektiert

Protokoll

10% Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München, Deutschland
10% SDS	BioRad, München, Deutschland
30% Acrylamide (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München, Deutschland
5% Bovine Serum Albumin Fraction (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Desoxycholicacid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

ECL-PLUS Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Darmstadt
HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteasen-Inhibitor-Cocktail Complete	Roche, Mannheim, Deutschland
Standard peqGOLD Protein-Marker II	Peqlab, Erlangen, Deutschland
TEMED	BioRad, München, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween-20	Fluka/Sigma, Deisenhofen, Deutschland

verwendete Detektions-Antikörper:

rabbit polyclonal anti-IRF4-Antibody	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-rabbit IGg-Antibody (Peroxidase-konjugiert)	Cell Signaling, Beverly, USA

Lysepuffer: 50mM Tris HCL pH7,5; 150mM NaCl; 100µM Natriumorthovanadat;
0,5% Natriumdesoxycholat; 4% NP-40; 2% Triton-X-100; 5mM EDTA;
300mM Sucrose; 1µl 25x-COMplete-Lösung pro 25µl Lysis-Puffer

25x-COMplete-Lösung (Protease-Inhibitor): 1 Tablette COMPLETE in 2ml H₂O

Sammelgel (10ml): 1,3ml 30% Acrylamidmix; 6,1ml destilliertes Wasser; 2,5ml
Sammelgel-Puffer pH6,8; 50µl APS; 10µl TEMED

<i>Puffer für Sammelgel:</i>	6,05mg 0,5mM Tris-HCL in 50ml destilliertem Wasser lösen; mit HCL auf pH6,8 titrieren; mit destilliertem Wasser auf 100ml auffüllen; 400mg SDS
<i>12% Trenngel (10ml):</i>	4ml 30% Acrylamidmix; 3,5ml destilliertes Wasser; 2,5ml Trennpuffer pH8,8; 3µl 10% APS; 6,66µl TEMED
<i>Puffer für Trenngel:</i>	18,2mg 1,5mM Tris-HCL in 50ml destilliertes Wasser lösen; mit HCL auf pH8,8 titrieren; mit destilliertes Wasser auf 100ml auffüllen; 400mg SDS;
<i>2x-Laemmli-Puffer für Proteinproben:</i>	30mM Tris-HCL pH6,8; 5% Glycerol; 1% SDS; 0,0025% Bromphenolblau; 30µl/ml Puffer -Mercaptoethanol
<i>10x-Elektrophorese-Puffer:</i>	144g Glycin (1,92M); 10g SDS (1%); 30g Tris (0,25M) in 1 Liter Wasser; pH8,3
<i>Transferpuffer:</i>	17,46g Tris; 8,79g Glycin; 11,25ml SDS 10%; 600ml Methanol; in 3 Liter Wasser
<i>TBS:</i>	24,22g 200mM Tris; 80g 1,37M NaCl; 1 Liter Wasser; pH7,6
<i>TBS-T:</i>	TBS + 0,05% Tween-20
<i>Blockierlösung:</i>	5% BSA, 1x-TBS, 0,1% Tween-20

Proteinextraktion

Nierengewebe wurde entnommen, durch einen Filter zerdrückt und in 500µl Lyse-Puffer (s. oben) 3x 10 Sekunden (Stufe 4) mit dem Ultra TURRAX T25 (Ika-Werke, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Um die Zellmembranen aufzubrechen und die Proteine frei zu setzten, wurden die Proben mit Hilfe des Sonicaters (Branson, Danbury, CT, USA) mit Ultraschall 3x 10 Sekunden behandelt (Stufe 6), wobei je eine Minute dazwischen pausiert und die Proben auf Eis gehalten wurden. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert und weitere 20

Minuten bei 14000 Umdrehungen/Minute bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, indem sich nun die extrahierten Proteine befanden, wurde in ein neues Gefäß pipettiert.

Messen der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration zu messen, wurden zuerst 1ml des Bio-Rad Protein-Assay-Reagenz A und 20µl des Bio-Rad Protein-Assay-Reagenz S (Reagenz S / Reagenz A 1:50) gemischt. Von dieser Mischung wurden je 25µl in die Vertiefungen einer 96-well-ELISA-Platte pipettiert. Dann wurden 5µl Proteinprobe und 200µl des Bio-Rad Protein-Assay B pro Well aufgetragen und das Ganze 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen (BSA) 0 ó 0,25 ó 0,5 ó 2 ó 3 ó 5 mg/ml (3x) aufgetragen. Die Proteinkonzentration wurde im ELISA-Gerät (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 620nm gemessen. Anhand der Standardkurve konnten die Konzentrationen der Proben abgelesen werden.

Proteine für den Western Blot aufbereiten

Die extrahierten Proteine wurden in 2x-Laemmli-Puffer (s. oben) mit β -Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

Gel herstellen

Zunächst wurde die Gelkammer zusammengebaut. Dann wurde erst das Sammelgel gemischt (s. oben), wobei TEMED erst kurz vor dem Gießen dazu gegeben wurde. Es dient der Polymerisation von Polyacrylamidgelen. Nach dem Gießen wurde etwas Isopropanol dazu gegeben, um einen geraden Abschluss des Gels zu erhalten. Nach etwa 20 Minuten war das Gel fest und das Isopropanol konnte abgegossen und nachgespült werden. Nun wurde das Trenngel hergestellt (s. oben), wobei TEMED wieder am Ende zugefügt wurde. Es wurde auf das erstarrte Sammelgel gegossen, die Kämme für die Vertiefungen wurden eingesteckt und man lies es ebenfalls fest werden.

SDS-PAGE

Nun wurde das Gel, nachdem die Kämme entfernt wurden, in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x-Elektrophoresepuffer (aus 10x-Puffer gemischt; s. oben) aufgefüllt. In die erste Vertiefung wurden 3µl peqGOLD Proteinmarker (Erlangen, Deutschland), in

die restlichen Vertiefungen wurden die 10µl Proteinproben (2 µg/µl) gegeben. Es wurde eine Spannung von 60V angelegt, bis die Proteine die Trennlinie erreichten (ca. 60 Minuten). Danach erfolgte die Auftrennung bei 150V (ca. 3 Stunden). Anschließend wurde das Gel auf eine Glasplatte in Transferpuffer (s. oben) gelegt.

Blotting

Die PVDV Immobilon-P Transfermembran (Millipore, Eschborn, Deutschland) wurde mit Methanol aktiviert und dann in Transferpuffer gelegt. Zwei Stapel mit je fünf Lagen Whatman-Papier wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde nun auf die Transfermembran gelegt und je ein Stapel Whatman-Papier wurde unter- bzw. oberhalb platziert. Nun konnte der Elektrottransfer gestartet werden (1 Stunde bei 25V). Danach wurde die Membran für 2 Stunden in Blockierlösung (s. oben) gehalten und anschließend 3x mit TBS und 1x mit TBS-T gewaschen.

Immunodetektion

Dazu wurde die Membran zuerst mit dem Primär-Antikörper gegen das IRF4-Protein (1: 1000 in TBS; Cell Signaling, Beverly, USA) über Nacht und anschließend mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (1:10000 in Blockierlösung; Cell Signaling) 1 Stunde auf dem Taumler inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubation erfolgten drei Waschschrte mit TBS und einer mit TBS-T.

Entwicklung

Für die röntgenologische Darstellung der Proteine wurden zunächst die ECL-Detektions-Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 40:1 (A:B) gemischt. Für die Entwicklung wurden 0,1ml/cm² benötigt. Nun wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben gerichtet auf Frischhaltefolie platziert, mit der Detektionslösung betropft und 5 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer inkubiert. Dann wurde überschüssige Detektionslösung gut abgetropft und mit Whatman-Papier getrocknet. Nun wurde die Membran erneut in frische Frischhaltefolie eingepackt, wobei vorsichtig alle Luftblasen rausgedrückt wurden. Sie wurde in eine Röntgenkassette gelegt und ein Filmstreifen darauf gelegt. Es wurde eine Entwicklungsreihe mit ansteigenden Zeiten wie folgt angefertigt: 30 sec. ó 1 ó 2 ó 5 ó 10 Minuten. Danach wurde entschieden, ob noch längere Inkubationen auf dem Filmstreifen nötig waren.

2.11 Isolation von Zellpopulationen aus Nieren und Milz

2.11.1. Isolation von Monozyten aus der Milz

RPMI-Medium: RPMI, 10% FCS, 1% PS

Es wurde mit sterilen Materialien und unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Milz wurde entnommen und sofort in eine sterile Petrischale mit 2 bis 3ml kalten RPMI-Medium (RPMI + 10% FCS + 1% PS) gelegt. Dann wurde sie zerdrückt und mit weiterem Medium durch einen Präseparationsfilter in einen Falcon gepresst. Die Suspension wurde 6 Minuten bei 1600 Umdrehungen/Minute bei 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Der Niederschlag wurde mit 4ml NH₄Cl (0,3M) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren und somit zu entfernen. Dann wurde die Suspension erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Auswaschen des NH₄Cl wurde der Niederschlag nun mit kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde mit 3ml RPMI-Medium resuspendiert und die Zellen mit Hilfe der Zählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter dem Mikroskop gezählt. Es wurden 5*10⁶ Zellen auf eine 6-well-Platte platziert und mit 3ml Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden nun im Zellinkubator (Heraeus, Osterode, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ drei Tage gezüchtet. Jeweils nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, indem das alte vorsichtig abgesaugt und neues aufgefüllt wurde. Beim Absaugen des Mediums wurden alle frei schwimmenden Zellen entfernt und nur die auf der Platte adhärierenden Zellen blieben zurück. Diese waren die zu isolierenden Monozyten/Makrophagen. Nach der Isolation und der Anzucht konnten die Stimulationsversuche mit Sauerstoffradikalen gestartet werden.

2.11.2. Isolation von Tubulusepithelzellen

HBSS-Medium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DMEM-Medium	GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D.
I-T-SS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
PGE-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Hydrokortison	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
T3	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Kollagen Typ IV	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kollagenase	Worthington Biochemical, Lakewood, USA

<i>HBSS/HEPES-Medium:</i>	HBSS, 10mM HEPES, 1% PS
<i>K1-Medium (incl. Hormone):</i>	450ml DMEM, 12,5ml 1M HEPES (pH7,55), 50ml FCS (10%), 5ml Hormonmischung, 1ml EGF (20-25ng/ml)
<i>Hormonmischung:</i>	100ml HBSS/HEPES, 0,12 U/ml I-T-SS, 1,25ng/ml PGE-1, 3,4pg/ml T3, 18ng/ml Hydrokortison, steril gefiltert
<i>Kollagenase-Mischung:</i>	15mg Kollagenase (151U/mg), 10ml HBSS, 93,75µl HEPES

Zunächst wurden die Zellkulturschalen mit 6 µg/cm² Kollagen (in PBS gelöst) für 2-6 Stunden inkubiert und anschließend die Flüssigkeit wieder abgesaugt. In der Zwischenzeit wurden zwei Nieren entnommen und vorsichtig von der Kapsel befreit. Dann wurden sie längs geschnitten und die Medulla entfernt. Anschließend wurden sie in kleine Stücke geschnitten und 1 Stunde in Kollagenaselösung bei 37°C (unter Sauerstoffsättigung aber luftdicht verschlossen) inkubiert. Nach der Kollagenasebehandlung wurden die Nierenstücke in HBSS/HEPES-Medium zerdrückt und das Medium auf 5ml aufgefüllt. Die Suspension wurde durch einen 30-µm-Filter in einen Falcon gepresst und anschließend 5 Minuten bei 4°C bei 1100 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit K1-Medium erst gut resuspendiert, dann auf 10 ml aufgefüllt und schließlich auf mehrere (nicht-Kollagen-beschichtete) Schalen verteilt (10 bis 12 ml Suspension pro Schale). Die Schalen wurden für 1 bis 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dies hatte zur Folge, dass Makrophagen und Fibroblasten am Boden adhärieren und somit leicht von den restlichen Zellen getrennt werden konnten. Im Anschluss an die Inkubation konnte die Suspension mit den nicht-adhären Zellen vorsichtig abpipettiert und in einen neuen Falcon gegeben werden. Die adhären Zellen wurden verworfen. Die Suspension wurde nun 5 Minuten bei 1100 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit K1-Medium resuspendiert und auf Kollagen beschichtete 12- bis 24-well-Platten verteilt (1ml/well). Die Zellen wurden nun im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gezüchtet, bis die Platten 70 bis 80% mit konfluierenden Zellen bedeckt waren (ca. 10 Tage). Dabei wurde alle drei Tage das Medium gewechselt. Nach der Züchtung konnten die Stimulationsversuche mit Sauerstoffradikalen gestartet werden.

2.11.3. Isolation von Zellpopulationen durch MicroBeads im Magnetfeld

verwendete Micro-Beads-Antikörper:

CD45 MicroBeads-monoklonaler anti-Maus-Antikörper	Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Deutschland
CD11c MicroBeads-monoklonaler anti-Maus-Antikörper	Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Deutschland

10x-PBS: 80,0g NaCl; 11,6g Na₂HPO₄; 2,0g KH₂PO₄; 2,0g KCl in 1 l Wasser, pH 7

Puffer: 1x-PBS, 5% BSA, 2mM EDTA, pH 7,2

Die Puffer und Lösungen wurden für die Prozedur vorgekühlt, die Gewebe/Zellen wurden zügig verarbeitet und auf Eis gehalten. Es wurde immer nur eine Maus nach der anderen geschlachtet, die Nieren entnommen und zügig verarbeitet. Dazu wurden IR- und Kontrollniere einzeln im Zellsieb zerkleinert und mit Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt: Mengenangaben von Reagenzien und Pufferlösungen bezogen sich immer auf 10⁸ Zellen. Nun wurde die Suspension erst 10 Minuten bei 2000 Umdrehung/Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 400µl Puffer resuspendiert. Dann wurden 100µl CD11c-Microbeads dazu gegeben und 20 Minuten bei 4°C langsam rotierend inkubiert. Dann wurde erneut 10 Minuten bei 2000 Umdrehung/Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 500µl Puffer resuspendiert. Dies diente dem Entfernen aller nicht anhaftenden Antikörper. Nun erfolgte die eigentliche Zellseparation über einer LS-Säule (Miltenyi Biotec, Deutschland) im Magnetfeld. Dazu wurde zunächst die LS-Säule mit 3ml Puffer vorgespült. Dann wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen und mit 3x 3ml Puffer gespült. Der Durchfluss wurde aufgefangen; dies waren die CD11c-negativen Zellen. Die CD11c-positiven Zellen befanden sich in der Säule, die vom Magnet entfernt und mit 5 ml Puffer in ein neues Falcon gepresst wurde. Diese Zellen wurden nun zentrifugiert, der Überstand verworfen, mit 500µl Lysis-Puffer (+ 1% β -Mercaptoethanol) 1 Minute gevortext und somit für die weitere RNA-Isolation vorbereitet. Die lysierten Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Die CD11c-negativen Zellen wurden, entgegen des eigentlichen Protokolls, weiter verarbeitet. Nach dem Zentrifugieren (Überstand verworfen) wurden sie mit 900µl Puffer resuspendiert und mit 100µl CD45-Antikörper (Miltenyi Biotec, Deutschland) für 20 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Vorgehen bei der CD11c-Isolierung. Im Durchfluss dieses Durchgangs waren CD45-negativen (und CD11c-negativen) Zellen und in der Säule waren CD45-positiven (und CD11c-negativen) Zellen. Auch diese Zellpopulationen wurden mit Lyse-Puffer für die weitere RNA-Aufbereitung lysiert und eingefroren.

2.12 Stimulation von Zellen mit Sauerstoffradikalen

Hypoxanthin-Pulver Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Xanthinoxidase Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Hypoxanthin-Lösung: Stock: 62,5mM in 0,1M NaOH

Xanthinoxidase: Stock: 25U/ml (in Wasser verdünnt)

Hypoxanthin (C₅H₄N₄O) ist ein Purinderivat, das unter der Einwirkung der Xanthinoxidase zu Xanthin und diese weiter zur Harnsäure oxidiert werden. Dabei entstehen Sauerstoffradikale (32).



Es ist bekannt, dass Sauerstoffradikale vermehrt im Rahmen der IR entstehen (9). Um den Einfluss der Sauerstoffradikale auf die IRF4-Expression zu untersuchen, wurden Monozyten (aus der Milz isoliert) und Tubulusepithelzellen mit einer Mischung aus Hypoxanthin und Xanthinoxidase behandelt. In Pilot-Experimenten wurden ansteigende Hypoxanthinkonzentrationen (0,25 ó 0,83 ó 2,5 ó 5 ó 7,5 mM), ansteigende Xanthinoxidase-Einheiten (0,0005 ó 0,0017 ó 0,005 ó 0,01 ó 0,015 U/ml) und ansteigende Inkubationszeiten (1 ó 2 ó 4 ó 6 ó 12 ó 24 Stunden) getestet. Für die eigentlichen Versuche wurden schließlich folgende Konzentrationen verwendet: 2,5mM Hypoxanthin und 0,005 U/ml Xanthinoxidase. Beide Lösungen wurden zunächst getrennt hergestellt (s. oben). Für die Stimulation wurden pro *well* 2,5mM Hypoxanthin mit 0,005 U/ml Xanthinoxidase gemischt und auf die Zellen gegeben. Einige *wells* wurde nur mit 0,1M NaOH behandelt, um dessen Wirkung auf die Zellen zu überprüfen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator (Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) inkubiert. Es wurden folgende Inkubationszeiten getestet: 0 ó 1,5 ó 4 ó 8 ó 24 Stunden. Nach der Inkubation wurde aus den Zellen mRNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und IRF4- und HSP70-Konzentrationen mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.

2.13. Statistische Auswertung

Die experimentellen Gruppen bestanden meist auch 5 bis 6 Mäusen. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SEM) dargestellt. Die Gruppen wurden mittels *Student's t-test* verglichen. p-Werte von $< 0,05$ bzw. $< 0,01$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Kapitel 3:

Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 IRF4-mRNA-Basisexpression verschiedener Organe der C57BL/6-Maus

Von 6-Wochen alten, unbehandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (n=5) wurden folgende Organe entnommen: Milz, Thymus, Lymphknoten, Knochenmark, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Herz, Dünndarm, Dickdarm, Muskulatur und Haut. Aus den Organen wurde RNA isoliert, die dann in cDNA umgeschrieben wurde. Mittels quantitativer RT-PCR wurde anschließend die IRF4-mRNA-Expression gemessen, wobei die 18s-rRNA als Referenzgen getestet wurde. Dabei zeigte sich, dass die IRF4-Basisexpression in der Niere sehr niedrig ist, im Gegensatz zur Milz, Thymus und Knochenmark, die eine hohe Anzahl von Immunzellen aufweisen (Abbildung 26).

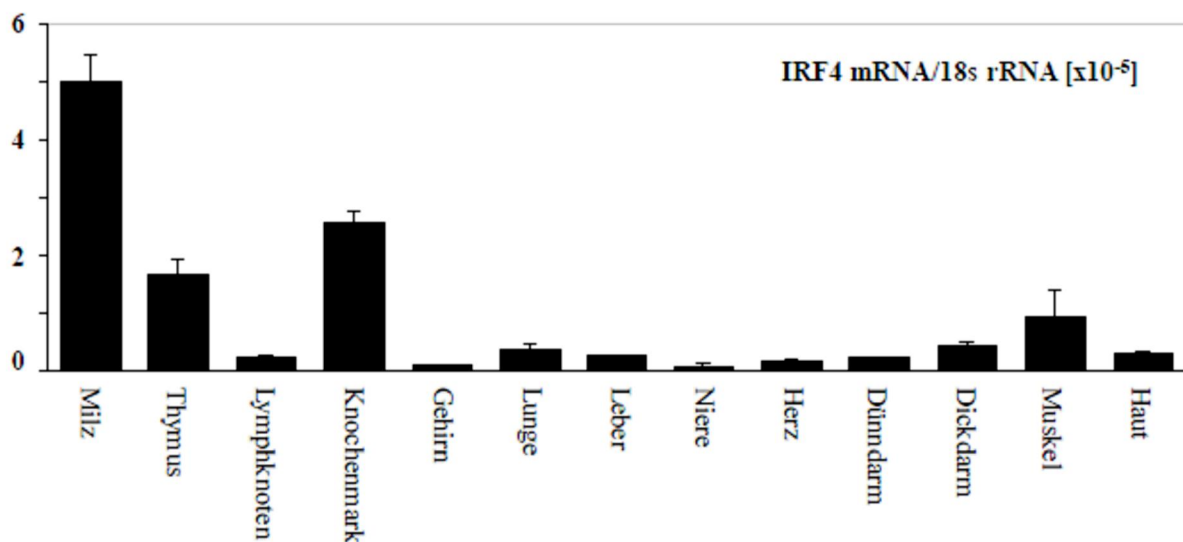


Abbildung 26: IRF4-mRNA-Basisexpression in verschiedener Organe der C57BL/6-Wildtyp-Maus. Von 6 Wochen alten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (n=5) wurden verschiedene Organe entnommen und die IRF4-Expression mittels qPCR gemessen. Ohne Stimulation wird IRF4 in der Niere nur gering exprimiert, während Milz, Thymus und Knochenmark eine relativ hohe IRF4-Basisexpression zeigen.

3.2 Zytokin-Basisexpression in IRF4^{+/+} und IRF4^{-/-} Mäusen

Aus unbehandelten Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen wurden Nieren und Milz entnommen und mittels qPCR verschiedene Zytokine bestimmt, um ein Basisprofil zu erhalten. Es werden die Mittelwerte aus jeweils 5 Mäusen dargestellt (\pm SEM). Die Zytokine sind alle auf einem niedrigen Level und weisen keine signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen auf.

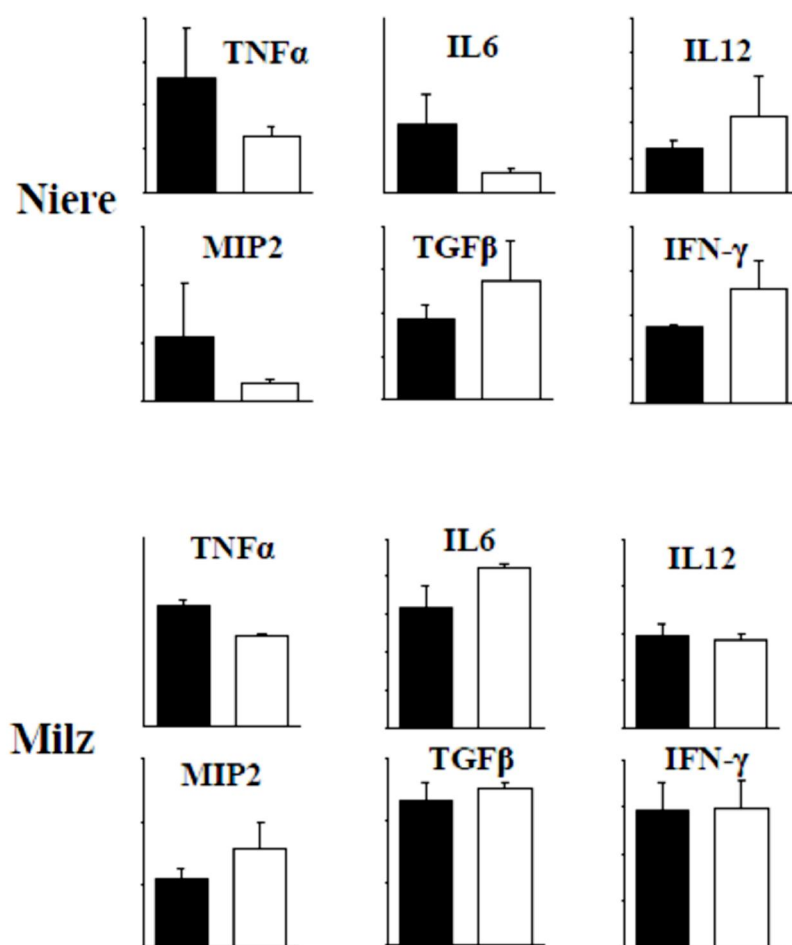


Abbildung 27-1 und 27-2: Basisexpression verschiedener Zytokine in Niere und Milz. Aus unbehandelten Mäusen wurde in Nieren und Milz Zytokine mittels qPCR bestimmt. Es werden Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse miteinander verglichen. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen vorhanden und die Zytokine sind auf einem niedrigen Level.

3.3 IRF4-Induktion durch Sauerstoffradikale

Zunächst wurden Monozyten aus der Milz und Tubulusepithelzellen von unbehandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (n=5) isoliert und angezüchtet. Anschließend wurden sie mit einer Mischung aus 2,5mM Hypoxanthin und 0,005 U/ml Xanthinoxidase stimuliert, wie unter dem Kapitel §Material und Methoden beschrieben. Durch die Reaktion beider Substanzen werden Sauerstoffradikale gebildet. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (0 ó 1,5 ó 4 ó 8 ó 24 Stunden) wurde aus den Zellen RNA isoliert, die dann in cDNA umgeschrieben wurde. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression des IRF4- und des HSP70-Gens gemessen (Abbildungen 28-1 bis 28-4). 18s-rRNA wurde wieder als Referenzgen getestet. Die Ergebnisse wurden aus den Mittelwerten (\pm SEM) von je drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Von HSP70 wurde erwartet, dass es in beiden Zelltypen exprimiert wird, wie es letztlich auch der Fall war. Damit konnte die Verwertbarkeit der PCR-Daten kontrolliert werden. Im Gegensatz dazu wird IRF4 nur in Monozyten exprimiert, wobei die Expression erst nach 24 Stunden signifikant ansteigt. Damit konnte gezeigt werden, dass IRF4 durch oxidativen Stress in Monozyten induziert werden kann, nicht jedoch in Tubulusepithelzellen. Durch die zeitlich verzögerte IRF4-Expression wird die in Gang gesetzte Entzündung wieder begrenzt bzw. beendet.

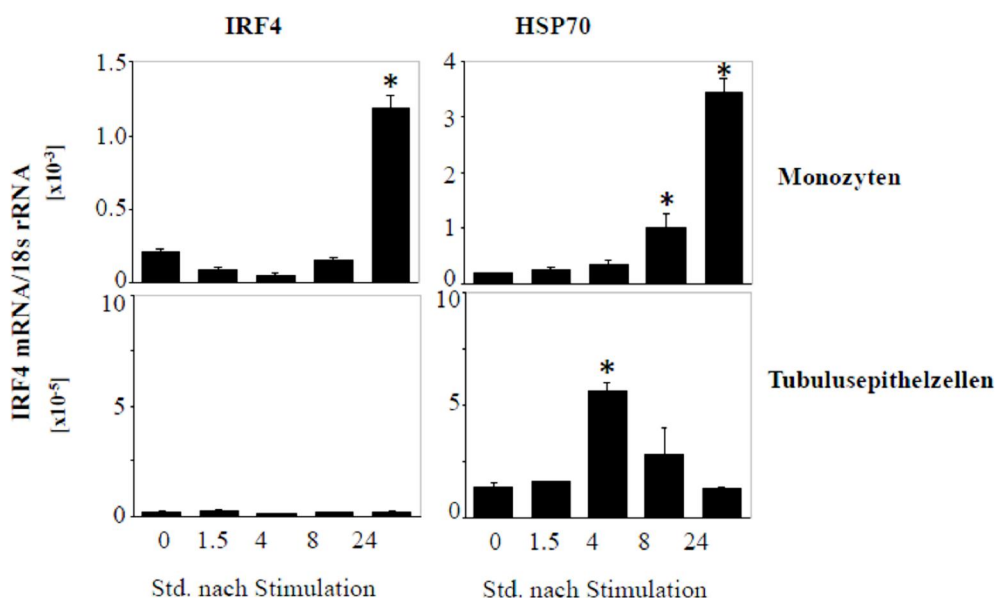


Abbildung 28-1 bis 28-4: IRF4-Expression nach Stimulation mit Sauerstoffradikalen. Nach der Stimulation von Monozyten und Tubulusepithelzellen mit Sauerstoffradikalen wurde die IRF4- und HSP70-Expression mittels qPCR getestet. Während HSP70 in beiden Zelltypen exprimiert wird, konnte IRF4 nur in Monozyten nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress ein weiterer Trigger für die IRF4-Induktion in Monozyten ist. In einer ansteigenden Reihe von Inkubationszeiten wird allerdings deutlich, dass die IRF4-Expression erst nach 24 Stunden signifikant ansteigt. * $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt-0

3.4 IRF4- und IRF5-Expression nach Ischämie-Reperfusion in der Niere

3.4.1 IRF4- und IRF5-mRNA-Level in der Niere nach renaler IR

Nachdem in Experimenten mit Zellen gezeigt wurde, dass oxidativer Stress die IRF4-Expression induziert, wurde diese Induzierbarkeit auch auf tierexperimenteller Ebene geprüft. Dazu wurden an C57BL/6-Wildtyp-Mäusen unilateral Nierengefäße für 45 Minuten abgeklemmt und nach Reperfusionszeiten von 1, 5 oder 10 Tagen sowohl die IR-Nieren als auch die *sham*-operierten Nieren entnommen. Mittels qPCR wurde die IRF4- und IRF5-Expression gemessen (im Verhältnis zur 18s-rRNA). Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 Mäusen, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). Die IRF4-Expression steigt nach IR im Zeitverlauf kontinuierlich an und zeigt signifikante Werte (im Verhältnis zur Kontrollniere) am Tag-5 und Tag-10. Auch hier wird deutlich, dass IRF4 erst spät im Verlauf induziert wird. Die Operation an sich hat keinen Einfluss auf die IRF4-Induktion, da die Kontrollnieren keine erhöhte IRF4-Expression zeigen (Abbildung 29-1).

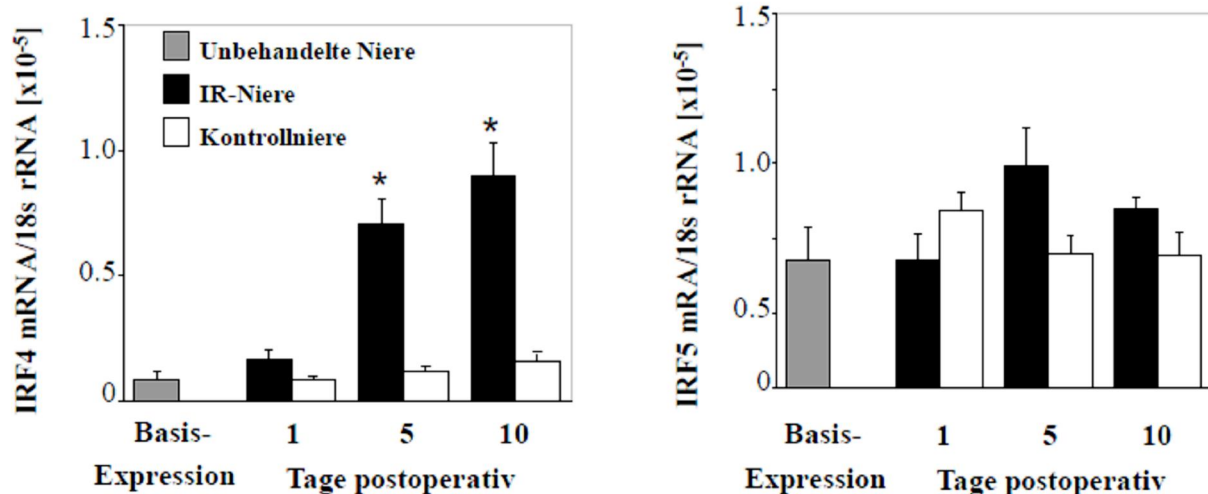


Abbildung 29-1 und 29-2: IRF4- und IRF5-mRNA-Level nach Ischämie-Reperfusion in der Niere. Nach unilateraler Abklemmung der Nierengefäße (Wildtyp-Mäuse) und anschließender Reperfusion wurden beide Nieren entnommen und die IRF4- und IRF5-Expression mittels qPCR getestet. Die Basisexpression beider Gene aus unoperierten Mäusen wird in grauen Balken dargestellt. Während die IRF4-Expression im Zeitverlauf kontinuierlich ansteigt und ab Tag-5 signifikant wird, zeigt sich bei der IRF5-Expression keine signifikante Veränderung. Verglichen mit IRF4 hat IRF5 allerdings eine sehr viel höhere Basisexpression. * $p < 0,05$ vs. Kontrollniere

Im Gegensatz zu IRF4 verändert sich die IRF5-Expression zu keinem Zeitpunkt signifikant, weist aber eine deutlich höhere Basisexpression als IRF4 auf (Abbildung 29-2). Somit konnte gezeigt werden, dass IR in der Niere die IRF4-Expression induziert, wobei ein deutlicher Anstieg erst spät im Verlauf sichtbar wird. Wie in der Einleitung beschrieben, wirkt IRF4 als kompetitiver Hemmstoff von IRF5 und reduziert dessen proinflammatorische Wirkung.

3.4.2 Untersuchung der IRF4-Proteine in der Niere nach renaler IR

Ein Teil der Nieren aus denselben Reperfusionsgruppen wurde verwendet, um die IRF4-Expression nach IR auf Proteinebene zu untersuchen. Nach der unilateralen Nierengefäßabklemmung an den Wildtyp-Mäusen (n=5), wurden die Proteine aus den Nieren isoliert und das IRF4-Protein im Western-Blot-Verfahren nachgewiesen. -Actin diente als Kontrolle und wurde in allen Proben ausgeprägt detektiert. Es zeigt die Verwertbarkeit der Experimente an. In unbehandelten Wildtyp- und IRF4-knockout-Mäusen, die als Positiv- bzw. Negativkontrolle getestet wurden, ist kein IRF4-Protein zu sehen. An allen drei Reperfusionszeitpunkten (1, 5 und 10 Tagen postoperativ) wird das IRF4-Protein nachgewiesen, in den *sham*-operierten Kontrollnieren nicht (Abbildung 30).

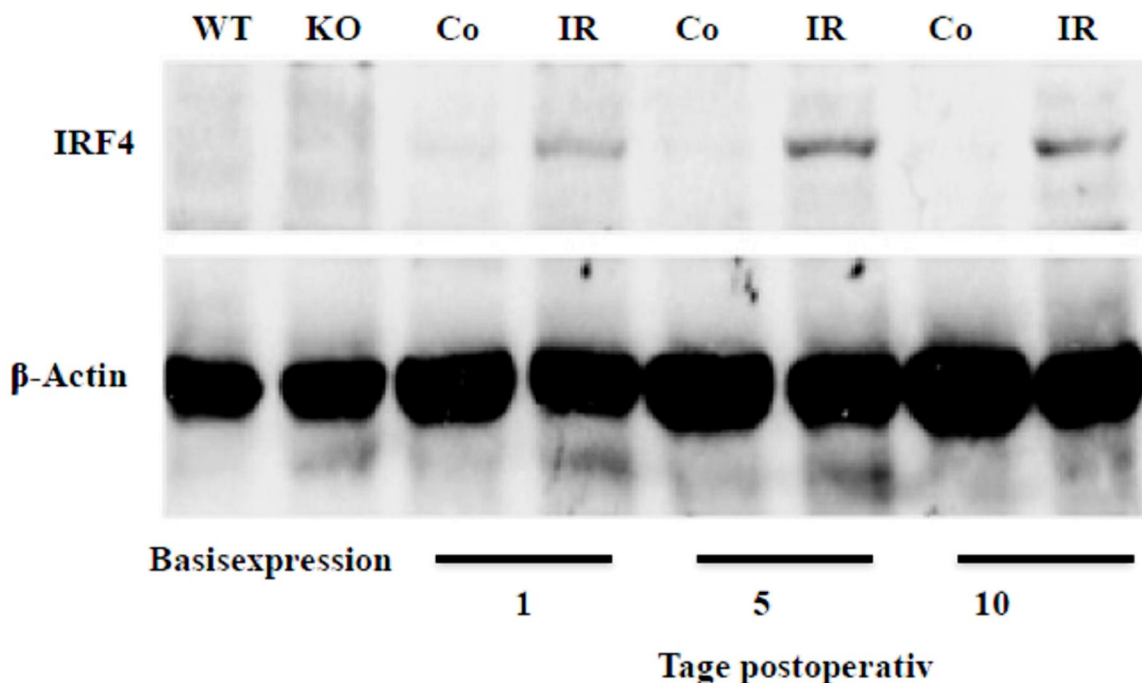


Abbildung 30: IRF4-Expression auf Proteinebene. Nach unilateraler Abklemmung der Nierengefäße an Wildtyp-Mäusen (n=5) wird das IRF4-Protein im Western-Blot-Verfahren in allen drei Reperfusionsgruppen (1, 5 und 10 Tagen postoperativ) nachgewiesen. In unbehandelten Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen ist es nicht zu sehen.

3.4 IRF4 wird in CD45/CD11c-doppelpositiven Zellen exprimiert

Nach unilateraler Abklemmung der Nierengefäßen an C57BL/6-Wildtyp-Mäusen wurden 24 Stunden postoperativ sowohl die IR- als auch die Kontrollnieren entnommen und (CD45+/CD11c+)- und (CD45-/CD11c-)-Zellen mit der Micro-Beads-Technik im Magnetfeld isoliert. Anschließend wurde die IRF4-Expression mittels qPCR ermittelt (18s-rRNA diente als Referenzgen). (CD45+/CD11c+)-Zellen repräsentieren hauptsächlich renale DCs und (CD45-/CD11c-)-Zellen sind renale Parenchymzellen. Die Werte von 5 Versuchstieren wurden gemittelt (\pm SEM). Hier konnte gezeigt werden, dass IRF4 nach IR in der Niere nur in (CD45+/CD11c+)-DCs exprimiert wird, nicht jedoch in renalen Parenchymzellen (Abbildung 31).

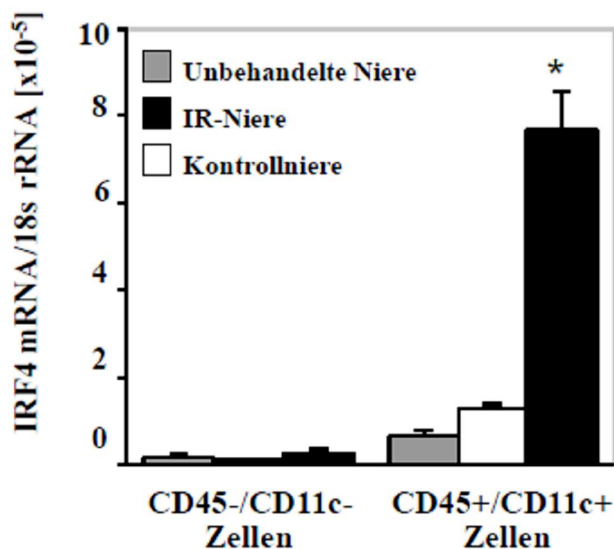


Abbildung 31: IRF4 wird nach Ischämie-Reperfusion in (CD45+/CD11c+)-Zellen exprimiert. An Wildtyp-Mäusen (n=5) wurden unilateral die Nierengefäße abgeklemmt und nach 24 Stunden Reperfusionszeit (CD45+/CD11c+)- und (CD45-/CD11c-)-Zellen aus den Nieren isoliert. Anschließend wurde in beiden Zellpopulationen die IRF4-Expression mittels qPCR ermittelt. Die grauen Balken zeigen die IRF4-Basisexpression unoperierter Mäuse. Nach IR ist IRF4 nur in (CD45+/CD11c+)-Zellen nachweisbar, nicht jedoch in den depletierten Zellen. *p<0,05 vs. Kontrollnieren

3.5 Antioxidantien heben IR-induzierte IRF4-Expression auf

In einem weiteren Experiment wurden C57BL/6-Mäuse (n=5) vor der unilateralen Operation mit Antioxidantien behandelt. Nach 1 Tag Reperfusion wurden aus den IR- und den Kontrollnieren wieder verschiedene Zellpopulationen isoliert und auf IRF4-Expression untersucht. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 5 Versuchstieren (\pm SEM). Die Vorbehandlung mit Antioxidantien hebt die IR-induzierte IRF4-Expression in (CD45+/CD11c+)-Zellen komplett auf (Abbildung 32). Dadurch wird deutlich, dass oxidativer Stress und im Besonderen Sauerstoffradikale maßgeblich an der IRF4-Induktion beteiligt sind.

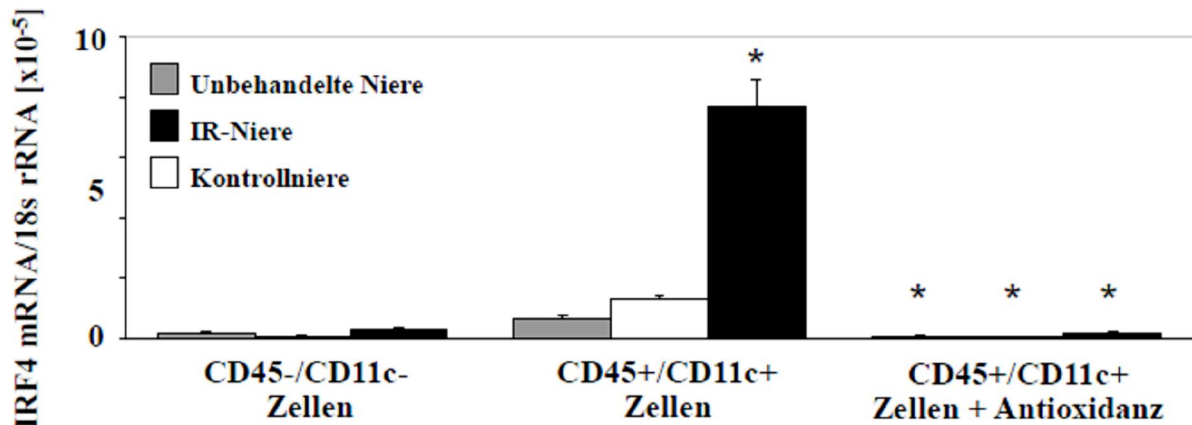


Abbildung 32: Antioxidanz hebt die IRF4-Induktion durch Ischämie-Reperfusion auf. Wildtyp-Mäuse (n=5) wurden vor IR der Nieren mit Antioxidantien behandelt. Die anschließende Zellisolation zeigt, dass damit die IR-induzierte IRF4-Expression in (CD45+/CD11c+)-Zellen komplett aufgehoben ist. *p<0,05 vs. ohne Antioxidanz

3.6 IRF4-/- verstärkt das Ausmaß des akuten Nierenversagens

Um die Rolle von IRF4 auf das ANV zu untersuchen, wurden Gruppen von Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen (n=5-6) einer bilateralen Abklemmung der Nierengefäße unterzogen und in Grafiken miteinander verglichen. Um ein ANV auszulösen, ist es nötig die Nierengefäße bilateral abzuklemmen, da eine Niere den Verlust der zweiten Niere vollkommen kompensieren kann. Nach 24 Stunden Reperfusion wurde den Tieren Blut abgenommen und die Kreatinin- und Harnstoffwerte im Serum gemessen. Beide Parameter sind gute Indikatoren für das ANV. In Wildtyp-Mäusen stieg das Kreatinin im Serum auf 1,6 mg/dl und der Harnstoff auf 339,8 mg/dl. In IRF4-defizienten Mäusen allerdings stiegen der Kreatininwert auf 2,9 mg/dl und der Harnstoffwert auf 474,4 mg/dl an. In beiden Fällen sind die Werte der IRF4-defizienten Tiere signifikant höher als die Werte der Wildtyp-Tiere (Abbildung 33). Im Umkehrschluss bedeutet das, dass IRF4 das Ausmaß des ANV reduziert.

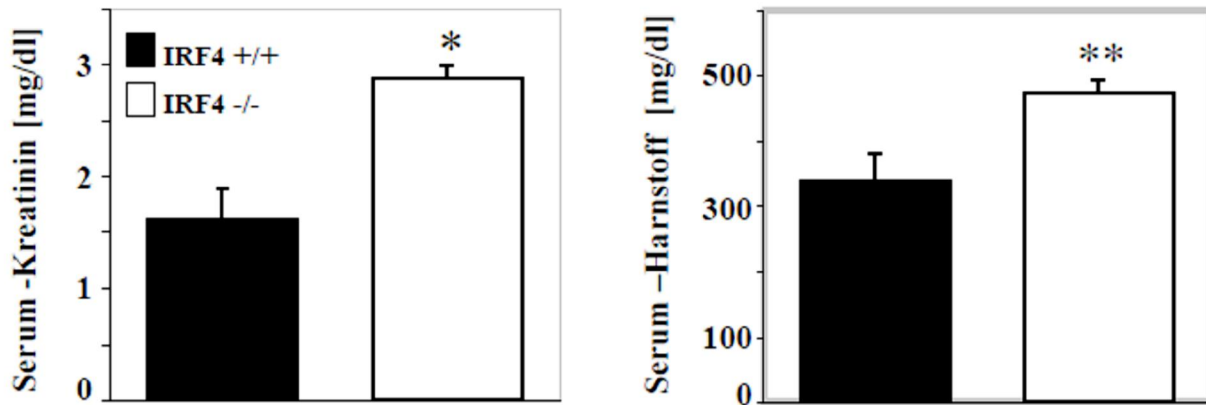


Abbildung 33: Kreatinin- und Harnstoffwerte im Serum. Nach bilateraler Abklemmung der Nierengefäße (+ 24 Stunden Reperfusion) zeigen IRF4-knockout Mäuse signifikant höhere Kreatinin- und Harnstoffwerte im Serum als Wildtyp-Mäuse. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus jeweils 5 bis 6 Mäusen (\pm SEM). * $p < 0,01$ vs. Wildtyp, ** $p < 0,05$ vs. Wildtyp

3.7 IRF4-/- verstärkt den Tubulusschaden nach Ischämie-Reperfusion

Um die Tubulusschäden zu ermitteln wurden Gruppen von Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse einer unilateralen Abklemmung der Nierengefäße unterzogen. Dabei wurden jeweils drei Gruppen gebildet: 1 Tag, 5 und 10 Tage Reperfusion. Nach der Reperfusionszeit wurden beide Nieren entnommen. Anhand von PAS-Färbungen wurde unter dem Mikroskop (100-fache Vergrößerung) der prozentuale Anteil der Tubulusschäden exploriert, wobei folgendes evaluiert wurden: Ausmaß der Nekrosen, der Verlust des Bürstensaums, Zylinderformationen und Erweiterung der Tubuluslumen im kortikomedullären Übergang. Dieser Bereich hat den größten Sauerstoffverbrauch und reagiert entsprechend empfindlich auf ischämische Zustände. Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 Mäusen, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). In allen drei Reperfusionsgruppen wurden signifikant mehr Tubulusschäden in den IRF4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen detektiert (Abbildung 34-1 und 34-2). In den Kontrollnieren wurden zu keinem Zeitpunkt signifikante Werte ermittelt. Das bedeutet, dass die Operation an sich keinen schädigenden Einfluss auf das Tubulussystem hat. Fazit dieses Experiments ist, dass IRF4-Defizienz IR-bedingte Tubulusschäden verstärkt.

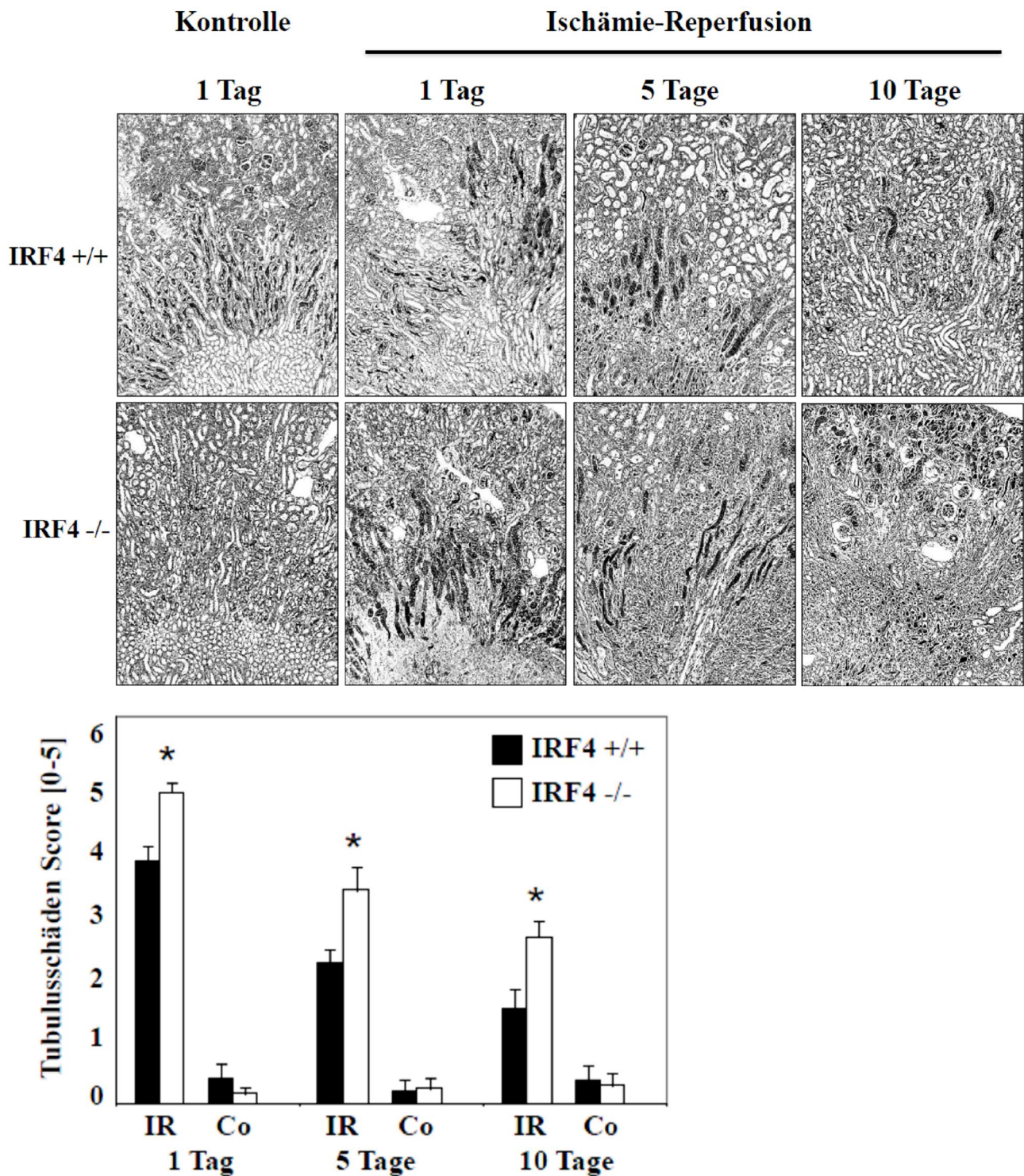


Abbildung 34-1 und 34-2: Schäden im Tubulussystem nach Ischämie-Reperfusion. Nach IR an Wildtyp- und IRF4-KO-Mäusen (n=5-6) wurde anhand von PAS-Färbungen das Ausmaß der Tubulusschäden in der Niere semiquantitativ mit Hilfe eines Scores evaluiert (\pm SEM). Es werden die Ergebnisse der IR- und der *sham*-operierten Kontrollnieren in 3 Reperfusionsintervallen dargestellt. In allen Zeitpunkten sind signifikant mehr Tubulusschäden in IRF4-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen detektierbar. IR [Ischämie-Reperfusion-Niere], Co [Kontrollniere]. * $p < 0,05$ vs. Wildtyp

3.8 IRF4^{-/-} verstärkt die Entzündungsreaktion nach Ischämie-Reperfusion

3.8.1 IRF4^{-/-} geht mit erhöhter Zytokin/Chemokin-Expression einher

Gruppen von Wildtyp- und IRF4-knockout-Mäusen (n=5) wurden einer unilateralen Abklemmung der Nierengefäße unterzogen und nach einer definierten Reperfusionszeit (1 - 5 -10 Tage) wurde die RNA aus der *gesamten* Niere isoliert (IR- und Kontrollniere getrennt). Dann wurde mittels qPCR die Zytokine TNF- und IL-6 und die Chemokine CXCL2/MIP2 und CCL2/MCP1 gemessen. Als Referenzgen wurde die 18s-rRNA getestet. Die Werte von 5 bis 6 Mäusen pro Gruppe wurden gemittelt (\pm SEM). IRF4-knockout-Tiere zeigen signifikant höhere Zytokin- und Chemokinwerte im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach 1 Tag Reperfusion, das Zytokin IL-6 zusätzlich nach 5 Tagen Reperfusion (Abbildung 35). Das bedeutet, dass IRF4-Defizienz mit einer erhöhten Entzündungsreaktion nach IR einhergeht, die letztlich zu verstärkter Tubulusschädigung führt.

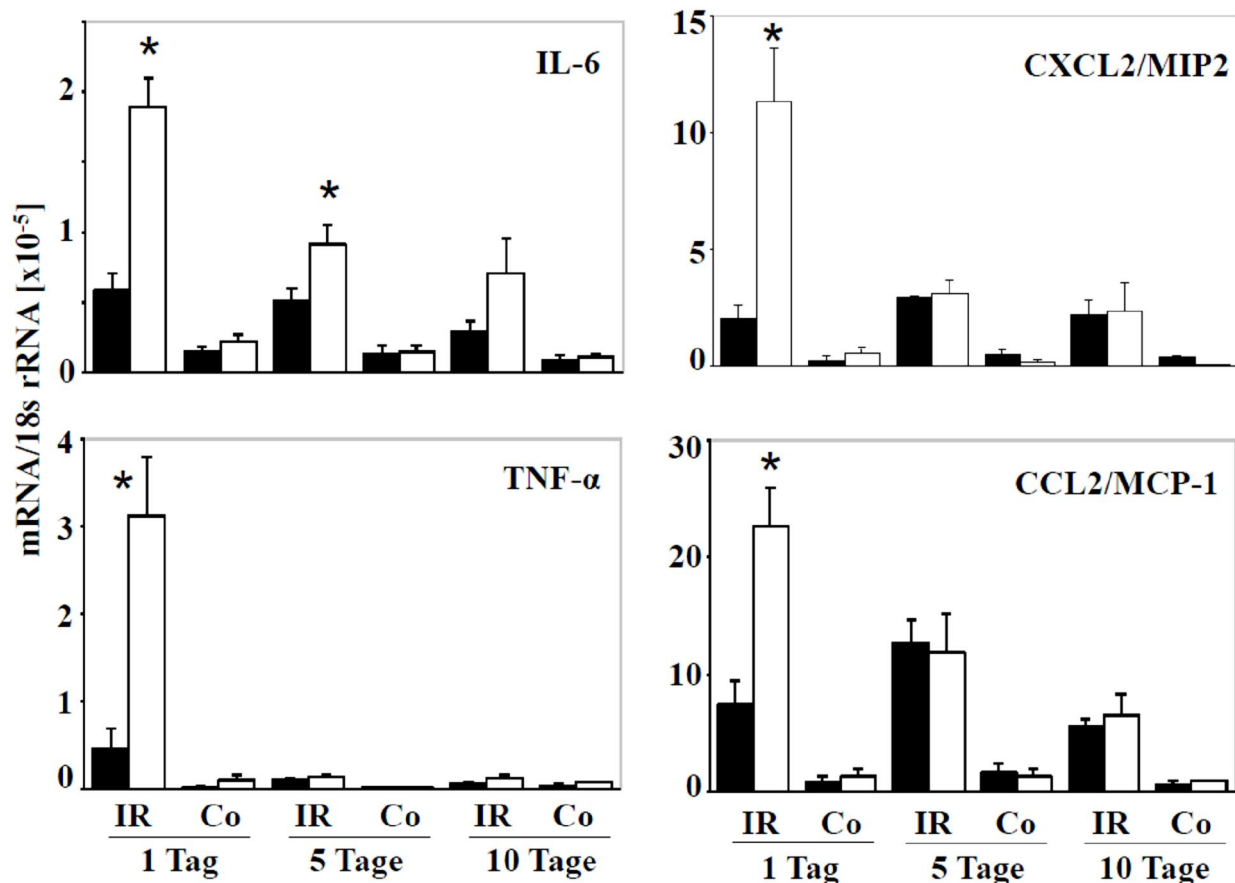


Abbildung 35-1 bis 35-4: Zytokin- und Chemokinexpression in der Niere nach Ischämie-Reperfusion. Nach unilateraler IR wurde aus der ganzen Niere RNA isoliert und mittels qPCR die Zytokin- und Chemokinexpression ermittelt. Es werden Wildtyp- und IRF4-knockout-Mäuse sowie IR- und Kontrollnieren (Co) in verschiedenen Reperfusionszeitpunkten miteinander verglichen. IRF4-defiziente Mäuse weisen signifikant erhöhte Zytokin- und Chemokinwerte auf nach 24 Stunden Reperfusion, IL-6 sogar zusätzlich nach 5 Tagen Reperfusion. IR (Ischämie-Reperfusion-Niere), Co (Kontrollniere). *p<0,05 vs. Wildtyp

Um differenzieren zu können, welche Zellen in der Niere nach IR vermehrt Zytokine und Chemokine exprimieren, wurde das letzte Experiment moduliert. Nach unilateraler Ischämie und 1 Tag Reperfusion an Wildtyp- und IRF4-knockout-Mäusen wurde aus den Nieren folgende Zellpopulationen mit Micro-Beads isoliert: (CD45+/CD11c+)-Zellen [*renale dendritische Zellen*], (CD45+/CD11c-)-Zellen [*andere CD45-positive Leukozyten*] und (CD45-/CD11c-)-Zellen [*renale Parenchymzellen*]. Die Zellen wurden ebenfalls auf folgende Zytokine und Chemokine mittels qPCR untersucht: TNF- α , IL-6, CXCL2/MIP2 und CCL2/MCP-1. 18s-rRNA diente als Referenzgen. Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 Mäusen, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). IRF4-defiziente Mäuse weisen signifikant höhere Zytokin- und Chemokinwerte in (CD45+/CD11c+) DCs auf, während andere CD45-positive Leukozyten nur vermehrt Chemokine exprimieren (Abbildung 36-1 bis 36-4). In den depletierten renalen Parenchymzellen ist kein Unterschied zwischen Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen zu sehen. Fazit ist, dass die proinflammatorische Aktivität DCs nach IR durch die IRF4-Induktion (Abbildung 31 und 32) gedrosselt wird.

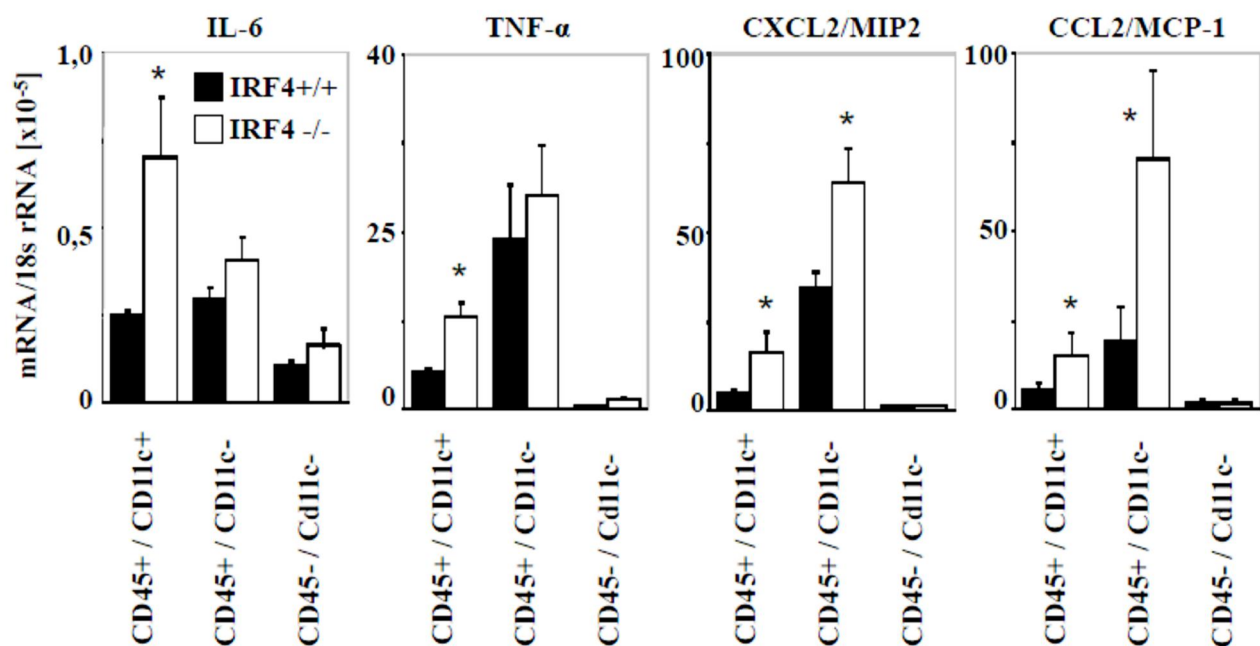


Abbildung 36-1 bis 36-4: Zytokin- und Chemokinexpression verschiedener Zellpopulationen nach Ischämie-Reperfusion. Nach unilateraler IR an Wildtyp- und IRF4-KO-Mäusen (n=5) wurden nach 24 Stunden aus den Nieren drei Zellpopulationen isoliert und anschließend verschiedene Zytokine und Chemokine gemessen. In IRF4-defizienten (CD45+/CD11c+)-Zellen werden signifikant mehr Zytokine/Chemokine exprimiert im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Die anderen CD45-positive Leukozyten IRF4-defizienter Mäuse weisen nur signifikant erhöhte Chemokinwerte auf. In CD45/CD11c-depletierten renalen Parenchymzellen ist kein Unterschied zwischen Wildtyp- und IRF4-knockout-Mäusen zu sehen. *p<0,05 vs. Wildtyp

3.8.2 IRF4^{-/-} geht mit erhöhter Neutrophilen-Rekrutierung einher

Konsistent mit den vorhergehenden Ergebnissen geht die IRF4-Defizienz mit erhöhter Neutrophilen-Rekrutierung einher. Um das zu untersuchen wurden immunhistochemische Färbungen von Nieren nach unilateraler IR angefertigt. Es wurden wieder drei Reperusionsintervalle getestet: 1 Tag, 5 und 10 Tage postoperativ. In jedem Schnitt wurden 10 Gesichtsfelder mit der höchsten Neutrophilendichte (high-power-fields) unter dem Mikroskop ausgezählt und deren Werte gemittelt (\pm SEM). Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 Mäusen, wobei sowohl Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse als auch IR- und Kontrollnieren (Co) verglichen wurden. In den ersten beiden Reperusionsgruppen sind signifikant mehr Neutrophile in IRF4-knockout-Mäusen detektierbar im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Nach 10 Tagen Reperfusion ist kein Unterschied zu sehen (Abbildung 37-1 und 2).

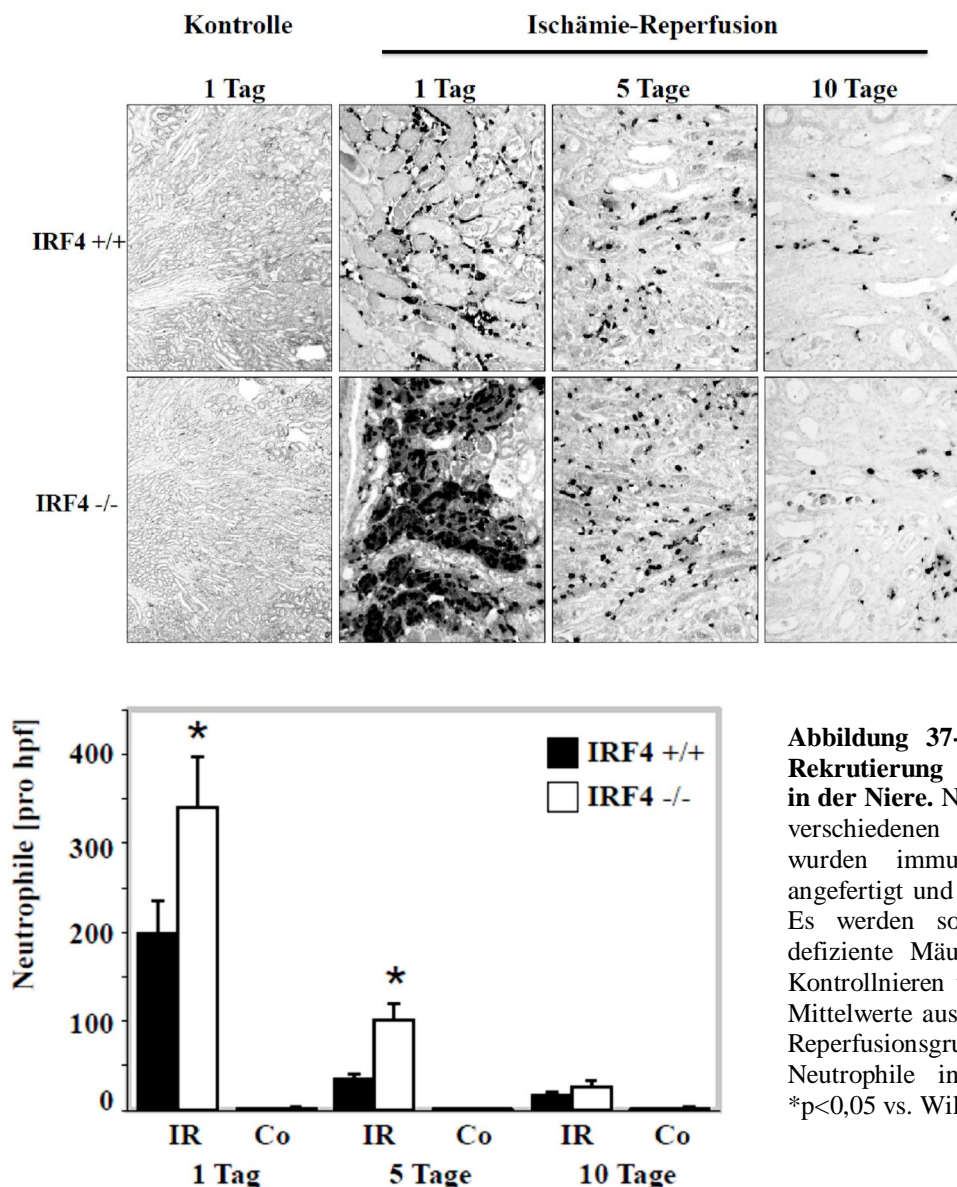


Abbildung 37-1 bis 37-2: Neutrophilen-Rekrutierung nach Ischämie-Reperfusion in der Niere. Nach unilateraler Ischämie und verschiedenen Reperusionszeitpunkten wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt und Neutrophilenzahlen ermittelt. Es werden sowohl Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse (n=5) als auch IR- und Kontrollnieren verglichen. Die Daten zeigen Mittelwerte aus 10 hpf. In den ersten beiden Reperusionsgruppen sind signifikant mehr Neutrophile in IRF4-defizienten Mäusen. *p<0,05 vs. Wildtyp

3.9.1 Renale Makrophagen- und T-Zell-Rekrutierung

Aus den gleichen Gewebeproben wurden immunhistochemisch F4/80-positive Makrophagen und CD3-positive T-Zellen gefärbt und deren Anzahl unter dem Mikroskop ermittelt. In beiden Fällen zeigt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen weder in den IR-Nieren noch in den Kontrollnieren. Im Vergleich der IR-Nieren mit den Kontrollnieren sind allerdings deutlich mehr Makrophagen in den IR-Nieren in allen drei Reperfusiongruppen. Die Anzahl T-Zellen sind ebenfalls in den IR-Nieren erhöht mit ansteigender Tendenz von Tag-1 bis Tag-10 (Abbildung 38 und 39). Das bedeutet, dass zwar die IR die Rekrutierung von Makrophagen oder T-Zellen in der Niere erhöht, der IRF4-Genotyp an sich jedoch keinen Einfluss darauf hat.

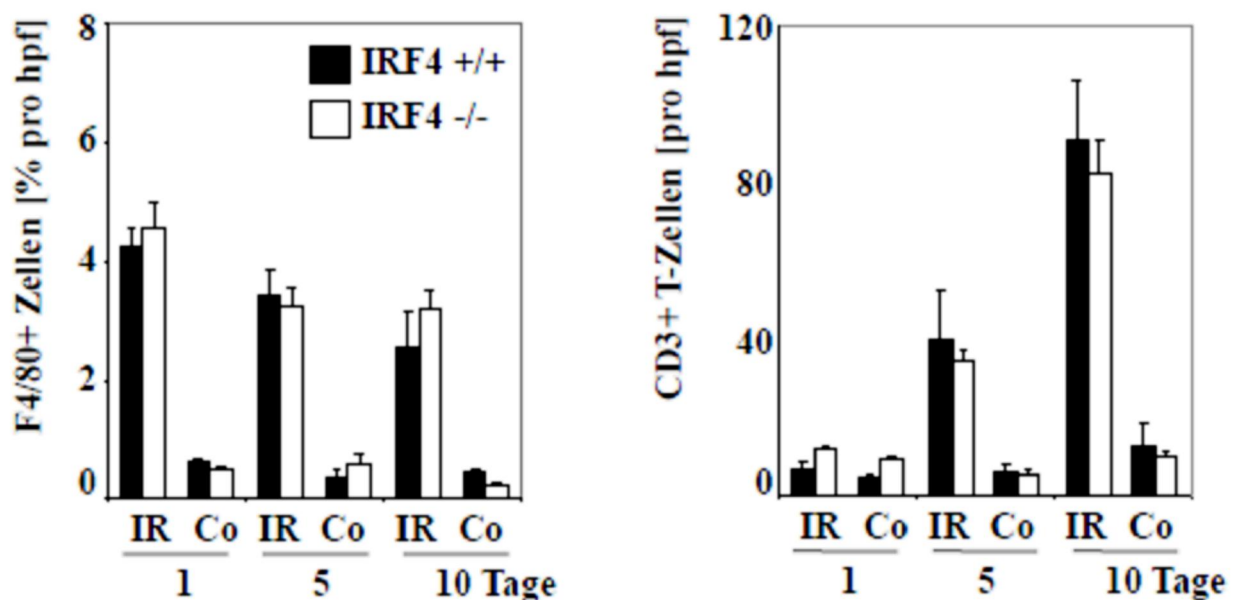


Abbildung 38 und 39: F4/80-Makrophagen und CD3-T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion in der Niere. Nach unilateraler Ischämie in der Niere wurden nach unterschiedlichen Reperfusionszeiten F4/80-Makrophagen und CD3-T-Zellen angefärbt und deren Anzahl ermittelt. Es werden sowohl Wildtyp- und IRF4-knockout Mäuse als auch IR- und Kontrollnieren miteinander verglichen. Jede Gruppe bestand aus 5 Mäusen, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). Weder Makrophagen noch T-Zellen zeigen einen Unterschied zwischen Wildtyp- und IRF4-knockout-Mäusen in den IR- oder Kontrollnieren.

3.10 Clodronat reduziert die Entzündung und das ANV in IRF4-/- Mäusen

Zu Beginn des Kapitels wurde gezeigt, dass renale CD45/CD11c-doppelpositive DCs maßgeblich für die IR-induzierte Zytokin- und Chemokinexpression in IRF4-defizienten Mäusen verantwortlich sind (Abbildung 36-1 bis 4). Aus der Beobachtung, dass in diesen Zellen zudem eine IR-induzierte IRF4-Expression detektierbar ist, im Gegensatz zu den renalen Parenchymzellen, lässt sich erschließen, dass die IRF4-Expression v.a. in diesen Zellen die Zytokin- und Chemokinexpression reduziert (Abbildung 31). Um die herausragende Rolle der DCs im Rahmen der IR und des ANV weiter zu untermauern, wurden Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse mit Clodronat behandelt. Das in Liposomen verpackte Clodronat wird spezifisch von Phagozyten aufgenommen, akkumuliert in der Zelle und zerstört sie letztendlich. Für dieses Experiment wurden die Clodronat-Liposomen 3 und 2 Tage vor der bilateralen Operation intraperitoneal injiziert. 24 Stunden postoperativ wurde Blut entnommen und Kreatinin und Harnstoff im Serum bestimmt.

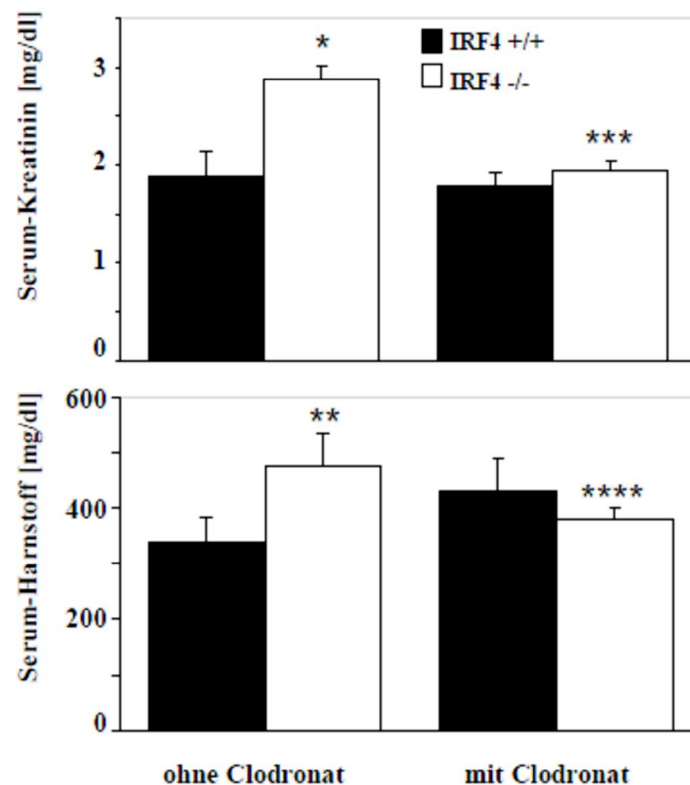


Abbildung 40-1 und 40-2: Serum-Kreatinin nach einer Clodronat-Behandlung. Nach der Clodronat-Behandlung wurden Nieren bilateral abgeklemmt und 24 Stunden postoperativ Kreatinin und Harnstoff im Serum bestimmt. Es werden Wildtyp- und IRF4-knockout-Mäuse (n=5) mit und ohne Clodronat-Behandlung verglichen. In IRF4-defizienten Mäusen wird durch Clodronat die Kreatinin- und Harnstoffwerte auf das Level der Wildtyp-Mäuse reduziert. *p<0,01 vs. Wildtyp; **p<0,05 vs. Wildtyp; ***p<0,01 vs. IRF4-/- ohne Clodronat; ****p<0,05 vs. IRF4-/- ohne Clodronat

In jeder Gruppe waren mindestens 5 Mäuse, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). Die Clodronat-Behandlung reduziert die Kreatinin- und Harnstoffwerte der IRF4-defizienten Mäuse auf das Level der Wildtyp-Mäuse (Abbildung 40-1 und 40-2). Von den gleichen Tieren wurden 24 Stunden postoperativ zusätzlich die Nieren entnommen und mittels qPCR Zytokine und Chemokine bestimmt. Sie werden mit unbehandelten Mäusen verglichen. In den Clodronat-behandelten Mäusen sind die signifikant erhöhten Zytokin- und Chemokinwerte der IRF4-defizienten Mäusen, wie sie in den unbehandelten Kontrolltieren zu sehen sind, nicht mehr vorhanden (Abbildung 41-1 bis 8). Das bedeutet, dass DCs maßgeblich für die Zytokin- und Chemokinexpression nach IR in der Niere verantwortlich sind, die durch IRF4 (in IRF4-suffizienten Mäusen) reduziert wird. Die erhöhte Entzündungsreaktion in IRF4-defizienten Mäusen verstärkt das ANV.

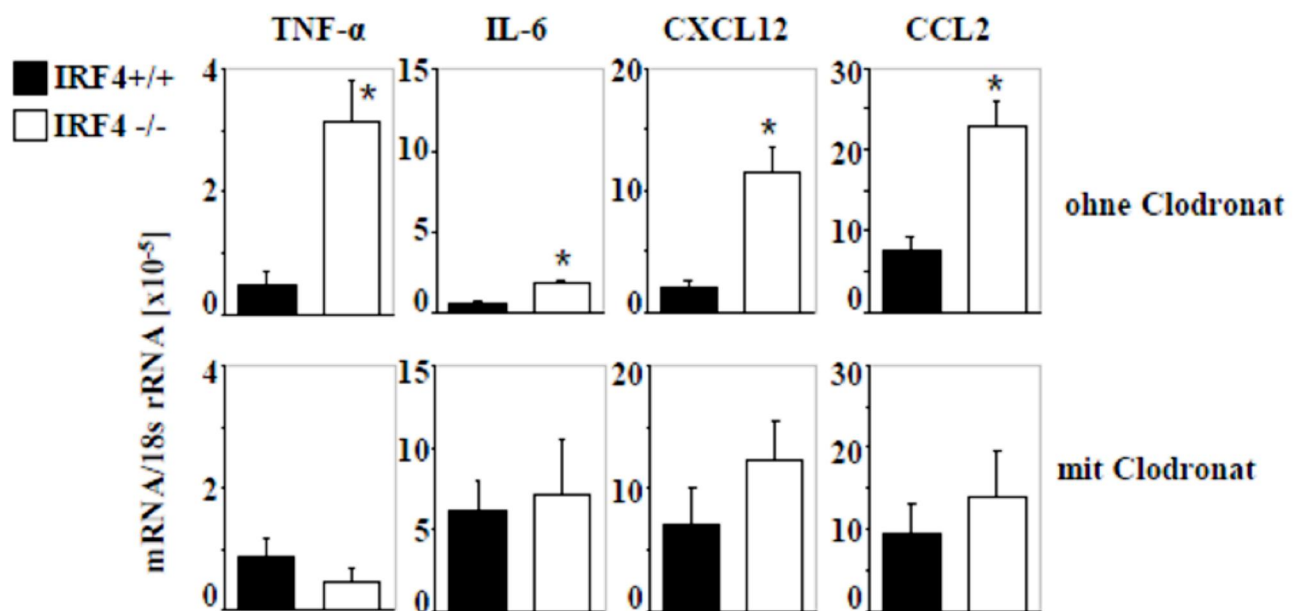


Abbildung 41-1 bis 41-8: Zytokine und Chemokine nach einer Clodronat-Behandlung. Nach bilateraler Abklemmung der Nieren werden in Clodronat-behandelten und unbehandelten Mäusen Zytokine und Chemokine bestimmt. Es werden Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse miteinander verglichen. In jeder Gruppe sind mindestens 5 Mäuse, deren Werte gemittelt werden (\pm SEM). Unbehandelt weisen IRF4-defiziente Tiere signifikant mehr Zytokine und Chemokine auf. Durch die Clodronatbehandlung wird dieser Unterschied aufgehoben. * $p < 0,05$ vs. Wildtyp

3.11 Etanercept reduziert die Entzündung und das ANV in IRF4-/- Mäusen

Da TNF- ein entscheidendes Zytokin in Rahmen der IR ist (Abbildungen 35-2 und 36-2), wurden Mäuse im folgenden Experiment mit dem TNF-Inhibitor Etanercept behandelt. Dafür wurden Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse einer bilateralen Abklemmung der Nierengefäße unterzogen und unmittelbar nach Eröffnung der Gefäße Etanercept verabreicht. Nach einer Reperfusionszeit von 24 Stunden wurden Kreatinin und Harnstoff im Serum als Parameter für das ANV bestimmt. Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 Mäusen, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). Die Etanercept-Behandlung reduziert die Kreatinin- und Harnstoffwerte der IRF4-defizienten Mäuse signifikant im Vergleich zu unbehandelten IRF4-defizienten Mäusen (Abbildung 42-1 und 2). Die Werte der Wildtyp-Mäuse verändern sich kaum.

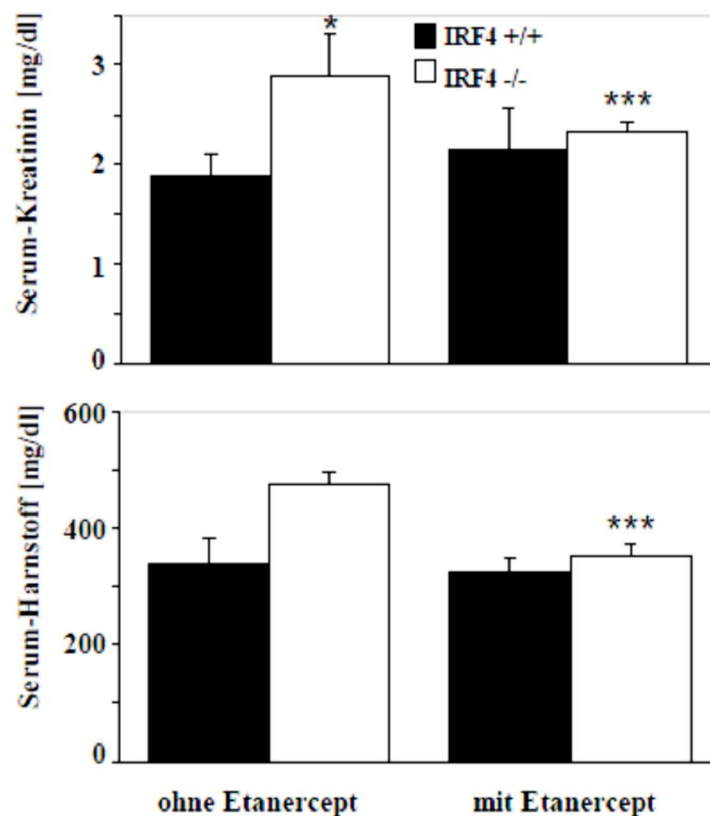


Abbildung 42-1 und 42-2: Kreatinin- und Harnstoffwerte nach einer Etanercept-Behandlung. Unmittelbar nach der bilateralen Abklemmung der Nierengefäße wird Etanercept gespritzt und nach 24 Stunden Kreatinin und Harnstoff im Serum bestimmt. Es werden Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse miteinander verglichen (n=5). IRF4-defiziente Mäuse weisen mit der Etanercept-Behandlung signifikant niedrigere Kreatinin- und Harnstoffwerte auf im Vergleich zu unbehandelten IRF4-defizienten Mäusen. *p<0,01 vs. Wildtyp; **p<0,05 vs. Wildtyp; ***p<0,01 vs. IRF4-/- ohne Etanercept

Von den gleichen Tieren wurden 24 Stunden postoperativ zusätzlich die Nieren entnommen und mittels qPCR Zytokine und Chemokine bestimmt. Sie werden mit unbehandelten Mäusen verglichen. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren blockt Etanercept die Induktion von TNF- α , IL-6, CXCL12 und CCL2 in IRF4-defizienten Mäusen (Abbildung 43-1 bis 8). Das bedeutet, dass die Induktion des stark proinflammatorische Zytokin TNF- α in DCs durch IRF4 geblockt werden muss, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu unterdrücken und so das Ausmaß des ANV zu reduzieren.

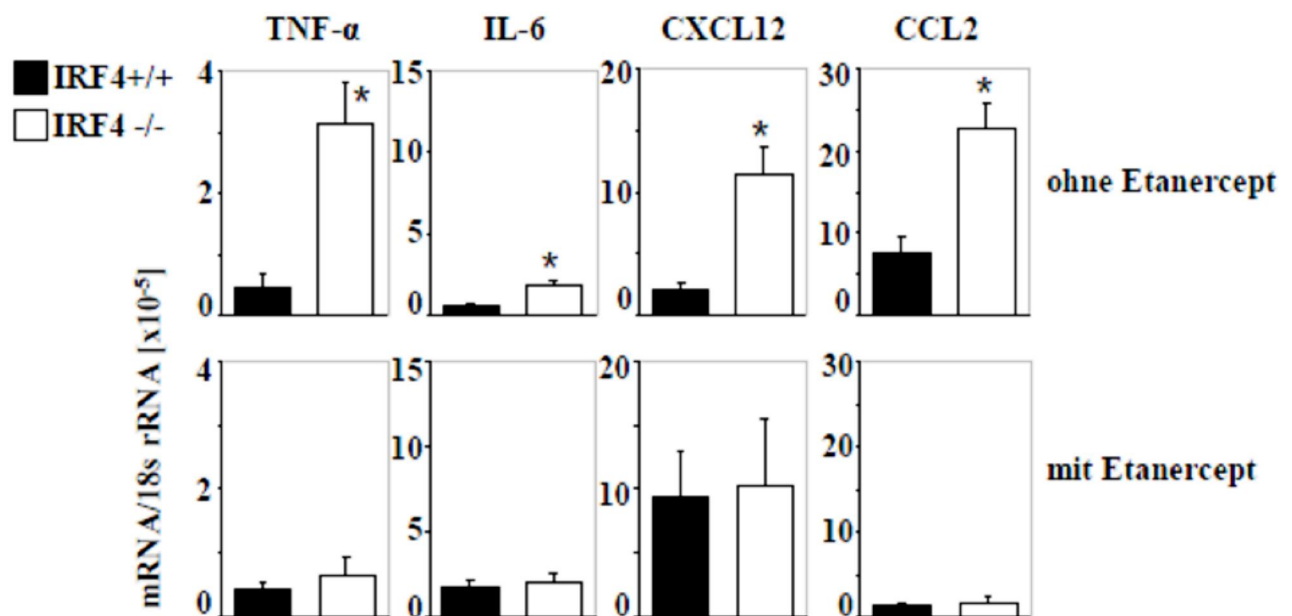


Abbildung 43-1 bis 43-8: Zytokine und Chemokine nach einer Etanercept-Behandlung. Nach bilateraler Abklemmung der Nieren werden in Etanercept-behandelten und unbehandelten Mäusen Zytokine und Chemokine bestimmt. Es werden Wildtyp- und IRF4-defiziente Mäuse miteinander verglichen. In jeder Gruppe sind mindestens 5 Mäuse, deren Werte gemittelt werden (\pm SEM). Unbehandelt weisen IRF4-defiziente Tiere signifikant mehr Zytokine und Chemokine auf. Durch die Etanercept-Behandlung wird dieser Unterschied aufgehoben. *p<0,05 vs. Wildtyp

Kapitel 4:

Diskussion

4. Diskussion

Das akute Nierenversagen

Das ANV tritt am häufigsten bei schwerkranken intensivpflichtigen Patienten auf (4). Als Risikofaktoren gelten Operationen am Herzen oder der großen Gefäße (5), Sepsis (6) oder die Anaphylaxie. Aber auch Medikamentenbehandlungen (7), die die Niere schädigen oder bestehende chronische Nierenerkrankungen (4) sowie das hohe Alter des Patienten in einer immer älter werdenden Gesellschaft prädisponieren zum ANV (1). Gefürchtet werden dabei schwere extrarenale Komplikationen wie Flüssigkeitsretention mit Ödembildung z.B. in der Lunge, Elektrolytverschiebungen mit kardialen Auswirkungen, Entwicklung einer metabolischen Azidose und vielem mehr (4). Dementsprechend ist das ANV mit einer erheblichen Verschlechterung des Gesamtüberlebens assoziiert. In Studien konnte man allerdings zeigen, dass das ANV nicht nur einen Indikator für die Schwere der Grunderkrankung darstellt, sondern ein eigenständiger Risikofaktor für Mortalität und Morbidität ist (6). Je nach Grunderkrankung beträgt sie zwischen 20 und 50% und daran hat sich in den letzten drei Jahrzehnten trotz erheblicher Fortschritte in der medizinischen Entwicklung kaum etwas geändert (4). Subjektive Symptome verspürt der Patient v.a. zu Beginn des ANV nicht. Und wenn sich das ANV durch veränderte Flüssigkeits- und Elektrolytwerte bzw. Urinausscheidung anzeigt, hat die Nierenschädigung bereits statt gefunden (83). Sind die Parenchymschäden nicht zu stark ausgeprägt, ist das ANV auch reversibel. Allerdings benötigt die Niere einige Zeit, bis die Dysfunktion wieder ausgeglichen ist (4). Die einzige wirksame Therapie derzeit ist die Nierenersatztherapie mittels Dialyse, die im Prinzip nur symptomatisch die Folgen der Nierendysfunktion ausbalanciert. Allerdings senkt die Dialysebehandlung die Mortalität nicht ausreichend (6). Deshalb wird bei Risikopatienten v.a. auf Intensivstationen die Nierenfunktion, der Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt der Patienten engmaschig überwacht und ggf. ausgeglichen, um ein ANV primär zu verhindern bzw. so früh wie möglich zu erfassen. Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie des ANV und etwaiger prädisponierender Faktoren könnte in der Zukunft zu neuen therapeutischen Möglichkeiten verhelfen.

Das ANV entsteht durch eine renale Minderperfusion, die durch Volumenmangel, systemischer Vasodilatation aber auch durch reduziertes Herzzeitvolumen oder thrombotischen/embolischen Verschluss der Nierengefäße bedingt sein kann (4). Bei langanhaltender Hypoxie entstehen schließlich Parenchymschäden, die v.a. die S3-Segmente des proximalen Tubulussystems betreffen,

da hier durch die hohe Transportaktivität physiologisch bereits ein niedriger Sauerstoffgehalt vorherrscht (4). Die verlängerte Hypoxie zieht eine ganze Reihe zellulärer Veränderungen nach sich, die die Zellintegrität und die Funktion beeinträchtigen und schließlich zum nekrotischen Zelluntergang führt. Die Tubuluszelle verliert den Bürstensaum, der typische polare Aufbau geht verloren, die ATP-abhängigen Transportvorgänge kommen zum Erliegen und Zellen lösen sich von der Basalmembran (4, 9, 12). Aus ähnlichen Gründen wird das Endothel der Gefäße gestört, das die Permeabilität erhöht mit vermehrter Einschwemmung von Flüssigkeit, Zellen und Proteinen ins Interstitium. Durch das interstitielle Ödem werden die peritubulären Kapillaren komprimiert, das den hypoxischen Zustand aufrechterhält und verlängert (23, 24). Durch die nachfolgende Reperfusion werden zum Einen vermehrt Sauerstoffradikale produziert, die den Zellschaden verstärken. Zum Anderen werden im erhöhten Maße Immunzellen eingeschwemmt, die zur übermäßigen Immunreaktion beitragen (9). Früh schon in renalen IR werden Adhäsionsmoleküle zur Rekrutierung von Immunzellen und TLRs hochreguliert (23).

Die Hypoxie führt zu nekrotischem Zelluntergang von Tubulusepithelzellen und zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile (DAMPs), die von residenten Makrophagen und DCs phagozytiert werden (26). In der Niere repräsentieren gewebsresidente DCs die zahlenstärkste Zellpopulation (47). Sie verweilen in unreifer Form im Interstitium und detektieren und phagozytieren endogene und exogene Antigene. Als potente APCs präsentieren sie diese Antigene anschließend im Lymphknoten den T-Lymphozyten und aktivieren so das adaptive Immunsystem. In dieser Funktion sind DCs hauptsächlich bekannt (14, 48). Allerdings sind sie nach ihrer Aktivierung bereits viel früher als Initiatoren der frühen Entzündungsreaktion aktiv, indem sie Zytokine und Chemokine sezernieren. Dong et. al konnten zeigen, dass renale DCs die stärksten Produzenten von TNF- und anderen proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen nach renaler IR sind (47). Neben Immunzellen sind aber auch Tubulusepithel- und Endothelzellen aktiv an der sterilen Entzündung beteiligt. Nach IR werden neben Immunzellen auch auf Tubulusepithelzellen TLRs hochreguliert (23). TLRs sind wichtige PRRs des angeborenen Immunsystems, über die eine große Reihe von Mikroorganismen erkannt werden (14). Vermutlich sind sie aber auch an der Detektion von endogenen DAMPs nach nekrotischem Zelluntergang beteiligt (26). Die Aktivierung der TLR-Signalkaskaden führt schließlich zur vermehrten Zytokine/Chemokine-Sekretion. Es konnte gezeigt werden, dass v.a. TLR2 und TLR4 nach IR vermehrt auf Tubuluszellen exprimiert werden und zur der IR-bedingten Gewebeschädigung beitragen (28, 29). Die Induktion von proinflammatorischen Mediatoren erfolgt über MyD88-abhängige und unabhängige Signalkaskaden (30, 31). Konsistent damit zeigen TLR2-, TLR4- und MyD88-defiziente Mäuse geringere Parenchymschäden und

Funktionseinbußen nach IR in verschiedenen Organen wie Herz (84, 85), Leber (86) und Gehirn (87). Die proinflammatorische Funktion des Tubulusepithels im Rahmen der renalen IR konnte in einem weiteren Experiment demonstriert werden. In Zellen der S3-Segmente des proximalen Tubulus wird durch oxidativen Stress IRF1 induziert mit der Folge, dass vermehrt proinflammatorische Zytokine/Chemokine produziert werden. Die IRF1-Induktion erfolgt bereits 15 Minuten nach IR und ist dementsprechend ein Mediator der frühen Entzündungsreaktion in der postischämischen Niere (32). Interessanterweise konnte mit chimären Mäusen gezeigt werden, dass der Anteil des Tubulusepithels am Entzündungsgeschehen nach IR in der Niere stärker ist als der von myeloischen Zellen (28, 29). Dies steht nun im scheinbaren Gegensatz zur Beobachtung, dass intrarenale DCs die stärksten Produzenten von TNF- und anderen proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen sind (47). Unsere Hypothese ist, dass DCs in ihrer proinflammatorischen Funktion reguliert bzw. gehemmt werden. Dies konnte bereits für den Transmembranrezeptor SIGIRR gezeigt werden (50). Er wird *konstitutiv* und relativ ubiquitär exprimiert, so auch in Tubulusepithelzellen und myeloischen Zellen (77). Mit Hilfe von SIGIRR-defizienten und chimären Mäusen konnte demonstriert werden, dass SIGIRR v.a. DCs in ihrer proinflammatorischen Funktion inhibiert. SIGIRR-defiziente Mäuse entwickeln dementsprechend verstärkte Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden nach renaler IR (50). Neben solchen konstitutiv exprimierten Faktoren sind auch *induzierbare* Regulatoren nötig, um überschießende Entzündungsreaktionen gezielt einzudämmen. Aus dieser Überlegung heraus wurde in dieser Arbeit der negativ-regulatorisch wirkende Faktor IRF4 im Rahmen der renalen IR untersucht. Er gehört einer Familie von Transkriptionsfaktoren an, die hauptsächlich im IFN-System wirksam sind, aber auch sehr viel weitreichendere Funktionen im und z.T. auch außerhalb des Immunsystems aufweisen (58, 59). Es wurde gezeigt, dass die IRF4-Expression in Monozyten durch LPS-Stimulation induziert wird mit der Folge, dass Entzündungsparameter reduziert werden (63, 64). Diese entzündungshemmende Funktion wird vermutlich durch die Blockade des proinflammatorisch wirkenden Faktor IRF5 erzielt (63). In dieser TLR-Signalkaskade bindet IRF5 das Adaptermolekül MyD88 und wird dadurch aktiviert. Anschließend transloziert es entweder als Transkriptionsfaktor in den Nukleus oder es wirkt im Zytosol über NF- κ B. Beide Wege führen zur Induktion proinflammatorischer Zytokine/Chemokine (60, 66). Es konnte gezeigt werden, dass IRF4 die gleiche MyD88-Bindungsstelle wie IRF5 besetzt und so dessen proinflammatorische Funktion hemmt (63, 64) (Abbildung 12). Dabei ist die DNA-Bindungsdomäne von IRF4 nicht beteiligt (60). Er fungiert in dieser Kaskade also nicht als typischer Transkriptionsfaktor. Allerdings besitzt IRF4 auf DNA-Ebene auch eine antagonisierende Wirkung auf die transkriptionelle

Funktion von IRF1. Hier bindet es die gleiche Promotersequenz wie IRF1 und hemmt die Aktivierung von TRAIL-Genen (61). TRAIL ist ein Typ-2 Transmembranrezeptor und gehört der TNF-Superfamilie an. Dessen hauptsächliche Funktion ist es über die Interaktion mit den *death*-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Apoptose auszulösen (67, 68). Dies geschieht v.a. in Tumorzellen, konnte aber auch für Tubulusepithelzellen und Podozyten in der Niere gezeigt werden (88). Allerdings scheinen gesunde Zellen davor geschützt zu sein. Über sog. *decoy*-Rezeptoren wird diese proapoptotische Aktivität gehemmt, indem sie die eigentlichen Zielrezeptoren imitieren und die nachfolgende Signalkaskade hemmen. Dieses Prinzip trifft v.a. für den *decoy*-Rezeptor TRAIL-R3 (67, 68) und Osteoprotegerin (88) zu. Die Interaktion mit dem *decoy*-Rezeptor TRAIL-R4 hat allerdings eine aktivierende Wirkung auf NF- κ B. Dabei werden v.a. Faktoren induziert, die zur Apoptosehemmung führen (69). Es ist aber denkbar, dass über diesen Signalweg auch proinflammatorische Mediatoren induziert werden, ähnlich wie es für ein weiteres Mitglied der TNF-Familie, TWEAK, gezeigt werden konnte. TWEAK induziert u.a. über die Aktivierung von NF- κ B proinflammatorische Zytokine (88). Diese Beobachtung ist deshalb von Interesse, weil IRF4 neben IRF5 möglicherweise auch die proinflammatorische Funktion von IRF1 hemmt. Wang et al. haben herausgefunden, dass IRF1 durch IR vermehrt exprimiert wird und zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen führt. Allerdings wurde dies nur für Tubulusepithelzellen gezeigt (32). In diesen Zellen wird IRF4 allerdings nicht exprimiert, da es auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist. Die mögliche hemmende Funktion von IRF4 auf die proinflammatorische Funktion von IRF1 kann zumindest in Tubuluszellen nicht zum Tragen kommen.

Experimentelle Strategie

Ziel dieser Arbeit war es, die regulatorische Funktion von IRF4 im Rahmen der renalen IR zu untersuchen. Bisher war es unbekannt, ob oxidativer Stress überhaupt ein Trigger für die IRF4-Induktion darstellt. Da IRF4 nur in hämatopoetischen Zellen lokalisiert ist, eignet er sich besonders dazu, intrarenale DCs zu studieren, die erstens wichtige Initiatoren früher Entzündungsreaktionen im Rahmen der IR und zweitens die zahlenstärkste Zellpopulation in der Niere sind. Somit wurde versucht, den Anteil der DCs am sterilen Entzündungsgeschehen, dem konsekutiven Gewebeschaden und dem Nierenfunktionsverlust nach renaler IR zu ermitteln.

Dafür wurden in verschiedenen in-vitro- und in-vivo-Experimenten IRF4^{-/-} und IRF4^{+/+} C57-B1/6-Mäusen miteinander verglichen. In-vitro wurden Tubulusepithelzellen und Monozyten mit Sauerstoffradikalen stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitabständen die IRF4-Expression

gemessen. Da Sauerstoffradikale vermehrt unter oxidativen Stress entstehen, simulieren sie in dieser Experimentenreihe die IR in-vivo. Damit wurde die Induzierbarkeit von IRF4 durch IR geprüft. In-vivo wurden Nierengefäße in Mäusen bi- oder unilateral für eine definierte Zeit abgeklemmt und anschließend Entzündungsreaktion, Gewebeschaden und Nierenfunktion ermittelt. Pro Maustypus wurden drei Reperfusiongruppen mit folgenden Zeitintervallen gebildet: 1 Tag, 5 und 10 Tage postoperativ. Jede Gruppe bestand aus 5 bis 6 Mäusen. Um schließlich feiner zwischen Nierenparenchymzellen und Immunzellen differenzieren zu können, wurde das Nierengewebe mittels *Micro-Beads* im Magnetfeld in folgende Zellpopulationen isoliert: CD45+/CD11c+ Zellen (renale DCs), CD45+/CD11c- Zellen (andere CD45-positive Leukozyten) und CD45-/CD11c- Zellen (renale Parenchymzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Mesangiumzellen) (47). Anschließend wurden Zytokine/Chemokine in den einzelnen Populationen gemessen. Mit dieser Methode konnte im Gegensatz zur Messung der ganzen Niere heraus kristallisiert werden, welcher Zelltyp maßgeblich am Entzündungsgeschehen beteiligt ist. Für die Zytokin/Chemokin-Bestimmung wurde eine definierte Menge RNA benutzt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass erhöhte Werte nicht nur durch vermehrten Zustrom von Immunzellen, sondern hauptsächlich durch vermehrte Produktion der einzelnen Zelle entstehen. Letztlich wurden Mäuse mit Clodronat-Liposomen behandelt, um DCs zu eliminieren und anschließend erneut Entzündung, Gewebeschaden und Nierenfunktion nach induziertem ANV zu ermitteln. In einer letzten Versuchsreihe wurden Mäuse mit dem TNF-Inhibitor Etanercept behandelt, um die Rolle von TNF- im Rahmen des postischämischen sterilen Entzündungsgeschehens zu untersuchen.

IRF4 reguliert die Immunaktivität in intrarenalen APCs

Es wurde bereits gezeigt, dass IRF4 durch LPS induziert wird. Als Bestandteil von Gram-negativen Bakterien simuliert die LPS-Stimulation eine mikrobielle Infektion. Bisher war es unbekannt, ob oxidativer Stress ebenfalls zur IRF4-Induktion führt. Ohne Stimulation wird IRF4 in der Niere nur gering exprimiert, im Gegensatz zum Thymus oder dem Knochenmark (Abbildung 26). Wir konnten zeigen, dass die IRF4-Konzentration durch die Stimulation von Monozyten mit Sauerstoffradikalen (in-vitro) und durch IR in der Niere (in-vivo) signifikant ansteigt (Abbildung 28 und 29-1). Somit wurde oxidativer Stress als neuer Trigger für die IRF4-Induktion entdeckt. Wie zu erwarten war, konnte IRF4 dabei nur in Immunzellen, nicht jedoch in Tubulusepithelzellen gemessen werden (Abbildung 28). Bei detaillierter Untersuchung einzelner Zellpopulationen zeigte sich, dass IRF4 nach Abklemmung der Nierengefäße nur in CD45/CD11c-doppelpositiven Zellen und nicht in CD11c-negativen Zellen induziert wird (Abbildung 31). (CD45+/CD11c+)-Zellen

entsprechen hauptsächlich intrarenale DCs (89). Die Induzierbarkeit von IRF4 durch oxidativen Stress lässt sich durch die Behandlung der Mäuse mit dem Antioxidans MnTMPyP komplette aufheben (Abbildung 32). Dadurch wird die Bedeutung der Sauerstoffradikale für die Induktion von IRF4 nochmals verdeutlicht. Interessanterweise nimmt die IRF4-Konzentration frühestens 24 Stunden postoperativ signifikant höhere Werte an (Abbildung 28-1) mit einer kontinuierlichen Zunahme im weiteren Verlauf bis Tag-10. Im Gegensatz dazu steigt IRF1 bereits 15 Minuten nach IR signifikant an. IRF1 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach IR proinflammatorische Zytokine/Chemokine in den Zellen des S3-Segments des proximalen Tubulus induziert. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass nach IR in der Niere zunächst eine Entzündung in Gang gesetzt wird, die von verschiedenen Zelltypen, wie Tubuluszellen, Endothelzellen und Immunzellen ausgeht. Da intrarenale DCs die zahlenstärkste Population sind, ist zu erwarten, dass sie den größten Anteil am Entzündungsgeschehen tragen. Analog zur mikrobiellen Infektion hat die Entzündung den eigentlichen Sinn, den entstandenen Schaden zu beseitigen. Bei zu starker Entzündungsaktivität tritt allerdings das Gegenteil ein, der Gewebeschaden und mit ihm der Funktionsverlust wird verstärkt. Der zeitlich verzögerte IRF4-Anstieg dient schließlich dazu, die Entzündungsvorgänge wieder zu begrenzen bzw. zu beenden. Es ist davon auszugehen, dass die entzündungshemmende Wirkung von IRF4 über die Antagonisierung des proinflammatorisch wirkenden Faktors IRF5 erfolgt. Im Gegensatz zu IRF4 wird IRF5 in der Niere konstitutiv exprimiert und weist eine relativ hohe Basisexpression auf, die durch oxidativen Stress nicht weiter ansteigt (Abbildung 29-2). IRF5 wird ubiquitär exprimiert (58). Durch die zellspezifische Expression von IRF4 in hämatopoetischen Zellen erfolgt die hemmende Wirkung von IRF4 entsprechend zellspezifisch nur in Immunzellen. In den in-vivo-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die IRF4-Defizienz mit signifikant höheren Werten für TNF- α , IL-6, MCP1 und MIP2, stärkerem Gewebeschaden und Verschlechterung der Nierenfunktion in allen drei Reperfusiongruppen assoziiert ist (Abbildungen 33-35). Im gleichen Maße werden signifikant mehr Neutrophile rekrutiert, während F4/80-Makrophagen und T-Zellen davon unbeeinflusst bleiben (Abbildungen 37-39). Das bedeutet im Umkehrschluss, dass die regulatorische Funktion von IRF4 nach renaler IR nötig ist, um eine überschießende Entzündung mit konsekutivem Gewebeschaden und Funktionsverlust der Niere zu reduzieren. In dieser Versuchsreihe wurde die Niere im Ganzen untersucht. Um schließlich feiner zwischen unterschiedlichen Zellen differenzieren zu können, wurden aus den Nieren nach IR die folgende Zellpopulationen isoliert: (CD45⁺/CD11c⁺), (CD45⁺/CD11c⁻) und (CD45⁻/CD11c⁻)-Zellen und im Anschluss erneut die Entzündungswerte gemessen. Dabei wird sichtbar, dass nur die Fraktion der IRF4-defizienten intrarenalen DCs (CD11c⁺/CD45⁺) erhöhte Zytokine/Chemokine

produzieren. Andere IRF4-defiziente CD45-positiven Leukozyten exprimieren nur erhöhte Chemokin (Abbildung 36). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Dong et al., dass DCs die stärksten Produzenten proinflammatorischer Mediatoren im Rahmen der renalen IR sind (47). Anschließend wurden in Mäusen vor der Nierengefäßabklemmung APCs mittels Clodronat-Liposomen eliminiert. Dadurch konnte der Phänotyp IRF4-defizienter Mäuse komplett aufgehoben werden. IRF4^{-/-} Mäuse zeigten dementsprechend keine erhöhten Entzündungs- und Serum-Kreatininwerte mehr im Vergleich zu IRF4^{+/+} Mäusen (Abbildungen 40, 41). Dadurch wird deutlich, dass diese Zellpopulation maßgeblich für die starke Entzündungsreaktion mit konsekutiver Gewebeschädigung und Nierenfunktionsverlust verantwortlich ist, dessen Ausmaße durch IRF4 reduziert werden. TNF- α ist ein hochpotentes proinflammatorisches Zytokin, das im Rahmen der renalen IR vermehrt produziert wird und eine ganze Reihe von Veränderungen nach sich zieht. Es potenziert das Entzündungsgeschehen in der Niere u.a., indem es weitere Entzündungsmediatoren induziert u.a. auch TNF- α selbst. Zusätzlich reguliert es die Expression von Adhäsionsmolekülen hoch und verstärkt die Infiltration von Leukozyten. Allerdings wirkt es auch direkt apoptotisch auf Tubuluszellen und verstärkt den Gewebeschaden. Da TNF- α vasokonstriktorisch wirkt, trägt es auch zur verlängerten Hypoxie in der Niere bei. Die vermehrte Expression von TNF- α in IRF4^{-/-} Mäusen nach renaler IR potenziert also den Schaden und die Funktionsverschlechterung der Niere besonders stark. In einer Versuchsreihe wurde TNF- α mit Etanercept blockiert mit dem Ergebnis, dass IRF4^{-/-} Mäuse keine höheren Entzündungswerte und keine schlechtere Nierenfunktion aufwiesen wie IRF4^{+/+} Mäuse (Abbildungen 42, 43). Die Blockade von TNF- α hat also den gleichen protektiven Effekt auf die Niere wie die Elimination der APCs. Dies betrifft maßgeblich renalen DCs, die als stärkste Immunzellpopulation in der Niere den größten Anteil der renalen TNF- α -Produktion bewerkstelligen.

Nach renaler IR tragen sowohl Tubulusepithelzellen, Endothelzellen und Immunzellen zur sterilen Entzündungsreaktion in der Niere bei mit dem eigentlichen Ziel, den entstandenen Schaden zu beseitigen. Bei zu starker Entzündung entsteht aber mehr Schaden als Nutzen, so dass Immunreaktionen reguliert und gebremst werden müssen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IRF4 durch oxidativen Stress induziert wird und Entzündungsparameter, Nierenparenchymschädigung und Nierenfunktionsverlust reduziert. Dabei spielt die Reduktion der TNF- α -Sekretion eine wichtige Rolle, da es als hochpotentes proinflammatorisches Zytokin die Entzündungsreaktion erheblich verstärkt. Da renalen DCs nach IR die Hauptproduzenten der renalen TNF- α -Sekretion sind, ist die entzündungshemmende Wirkung von IRF4 v.a. in dieser Zellpopulation von entscheidender Bedeutung.

Unterscheidung zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen

Es ist grundsätzlich schwierig Makrophagen und DCs experimentell isoliert zu untersuchen (90). Beide Zelltypen sind Phagozyten, residieren im Interstitium (46) und warten auf eindringende Mikroorganismen (14) oder freiwerdende endogene Zellbestandteile (26). Beide gehören zu der Gruppe der APCs und aktivieren dadurch andere Zellen, wobei DCs deutlich potentere APCs sind. Zudem sind Makrophagen und DCs beide Initiatoren der frühen Entzündungsreaktion. Diese Rolle ist für Makrophagen lange bekannt (14), für DCs ist sie allerdings eine relativ neue Erkenntnis (47, 76). Beide Zelltypen entspringen der myeloischen Zellreihe und weisen viele gleiche Oberflächenmoleküle auf, so dass die experimentelle Isolierung oft schwierig ist (Tabelle 7).

Tabelle 7: Oberflächenmarker von Makrophagen und DCs (89)

	F4/80-low	F4/80-high		F4/80-low	F4/80-high
	(Makrophagen)	(DCs)		(Makrophagen)	(DCs)
<i>Monozyten-Marker</i>			<i>DC-Marker</i>		
CD11b	hoch +	niedrig +	CD205	--	--
F4/80	niedrig +	hoch +	33D1	--	--
Ly6C	hoch +	--	CD11c	20-30%+	+
Gr-1 (Ly6G)	mittel +	--	IA	--	hoch +
CD204	--	+	CD80	--	--
CD206	--	--	CD86	--	+
M-CSFR	+/--	--	CD40	--	--
CX3CR1	niedrig +	hoch +	B7-DC	--	--
			B7-H1	--	+
<i>Adhäsions-Marker</i>			<i>TLR-Marker</i>		
CD62L	+	--	TLR2	+	+
VLA-4	hoch +	niedrig +			
LFA-1	hoch +	niedrig +			

CD45 ist ein Marker, der auf allen Leukozyten exprimiert wird. Li et al. konnten zeigen, dass 50% der CD45-Leukozyten F4/80-positiv sind. Diese Population lässt sich nun in zwei weitere Gruppen einteilen: Zellen mit hoher bzw. niedriger F4/80-Expression. Dabei repräsentiert die Zellen mit der hohen F4/80-Expression residente DCs, die an sich schon 40% der CD45-Leukozyten ausmacht (89). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Dong et al., dass residente DCs die zahlenstärkste Population in der gesunden Niere sind (47). Zellen mit niedriger F4/80-Expression sind Makrophagen, die nach IR in die Niere in großen Mengen infiltrieren. Während residente DCs eine nahezu gleichbleibende Zellzahl aufweisen, vervielfacht sich die Anzahl der Makrophagen um das 4 bis 8-fache nach renaler IR (89). In der unbeeinträchtigten Niere sind Makrophagen im Verhältnis zu DCs relativ wenig vertreten und deren Lokalisation beschränkt sich auf periarteriell Bindegewebe, Kapsel und Nierenbecken (91). Im Gegensatz dazu sind DCs sehr stark vertreten und im Interstitium der ganzen Nieren weit verteilt vorhanden (47). Durch die Injektion mit Clodronat-Liposomen in zunächst unbehandelte Mäuse werden APCs eliminiert (www.clodronateliposomes.org). Die Methode ist relativ spezifisch für Phagozyten aus den folgenden Gründen: 1. Die Lipiddoppelschicht der Liposomen eignete sich gut zur Phagozytose. 2. Intrazellulär wird die Lipidschicht durch lysosomale Phospholipasen aufgelöst. Das in der Zelle freiwerdende Clodronat kann durch seine hydrophilen Eigenschaften nicht mehr entweichen. Es akkumuliert in der Zelle und zerstört sie somit. 3. Aus den gleichen Gründen kann Clodronat, das in die Blutbahn gerät, nicht in andere Zellen aufgenommen werden (79). Andere CD45-positive Zellen, wie Monozyten, Neutrophile oder T-Zellen werden nicht nennenswert reduziert (47). Es werden nicht wie gewünscht DCs ausreichend spezifisch eliminiert (90). Da sie aber den größten Anteil der APCs in der Niere ausmachen, reduziert die Clodronat-Behandlung hauptsächlich die proinflammatorische Wirkung dieser großen Zellpopulation, die unter physiologischen Bedingungen die frühe Entzündungsreaktion in der Niere nach IR maßgeblich initiiert (47). Dadurch wird die Entzündungskaskade deutlich gebremst und schließlich weniger Leukozyten rekrutiert. Dies liegt zum Einen sicherlich auch daran, dass neben DCs auch Makrophagen von der Clodronat-induzierten Elimination betroffen sind. Allerdings fehlt mit den residenten DCs auch die primäre Ausschüttung chemotaktischer Zytokine, so dass primär weniger Neutrophile und Makrophagen angelockt werden. Makrophagen und DCs haben viele identische Oberflächenmarker, z.T. mit unterschiedlicher Expressionsdichte. Auf intrarenale DCs wird relativ zuverlässig der Oberflächenmarker CD11c exprimiert (Abbildung 45). Allerdings ist er auch zu 20-30% auf Makrophagen nachweisbar (Tabelle 7). Mittels der Micro-Beads-Technik wurden (CD45+/CD11c+)-Zellen isoliert, die dementsprechend 70-80% DCs enthalten (89).

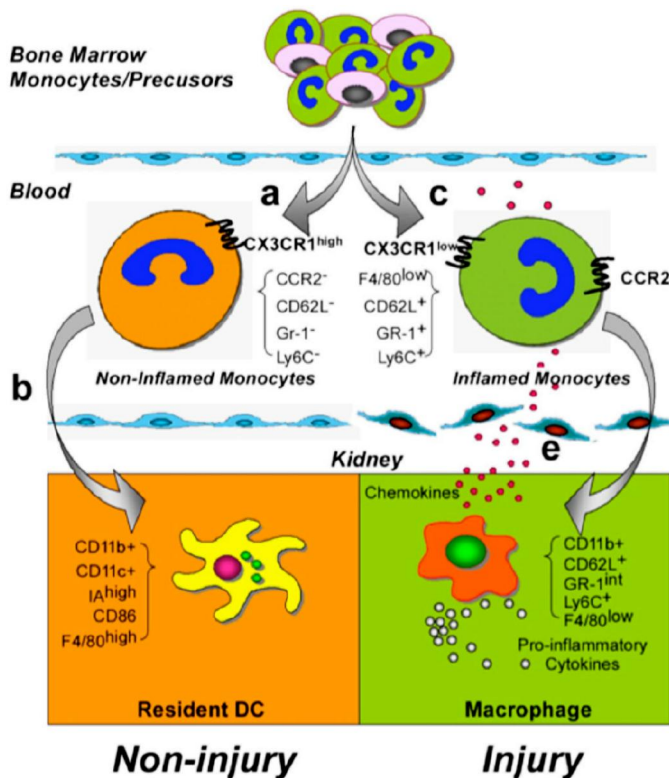


Abbildung 45: Makrophagen und dendritische Zellen. Beide Zelltypen entstammen der myeloischen Zellreihe. Die Ausschwemmung von Monozyten aus dem Knochenmark ins periphere Blutsystem ist CCR2-abhängig. a: Im Verlauf verliert eine Gruppe die CCR2-Expression. b: Diese Zellen wandern früh schon in nicht-entzündliches Gewebe ein und differenzieren zu residenten DCs. c: Die andere Gruppe behält ihre CCR2-Expression und repräsentiert zirkulierende Monozyten. d: Sie wandern erst nach Aktivierung in entzündliches Gewebe ein (89).

Wie häufig in experimentellen Versuchen konnten DCs zwar nicht zu 100% isoliert oder eliminiert werden, allerdings doch immer zu einem sehr großen Prozentsatz, so dass sich die Ergebnisse sehr viel stärker auf DCs als auf Makrophagen beziehen lassen. Da DCs als zahlenstärkste Immunzellpopulation in der Niere ganz am Anfang der sterilen Entzündungskaskade stehen, greift die Elimination dieser Zellpopulation bereits ins Geschehen ein bevor Makrophagen richtig relevant werden bzw. ins Spiel kommen.

IRF4-Defizienz

Als Transkriptionsfaktor hat IRF4 zahlreiche Funktionen im Immunsystem. Dementsprechend geht die IRF4-Defizienz mit Immundefiziten einher, die die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflussen könnten. Maßgeblich ist IRF4 in der Regulation der B- und T-Zell-Entwicklung und Differenzierung beteiligt. In IRF4-defizienten Mäusen werden beispielsweise keine Plasmazellen gebildet. Auch in der Rezeptoreditierung spielt IRF4 eine Rolle (71), so dass in IRF4-/- Mäusen keine Antikörperproduktion möglich ist und die Toleranzentwicklung gegenüber körpereigenen Antigenen nicht oder nur mangelhaft ausgebildet wird (70, 71). In der T-Zellreihe führt die IRF4-Defizienz zu gestörten T-Zell-Immunantworten (72, 73). Dies sind allerdings Aspekte des adaptiven

Immunsystems, das für die frühe Phase des ANV kaum eine Rolle spielt. Im Rahmen des ischämischen ANV kommt es neben Neutrophilen und Makrophagen ebenfalls zur Infiltration von Lymphozyten, allerdings erst mit einer Latenz von vielen Tagen (92). In einer Arbeit wurde zwar gezeigt, dass der Mangel an B-Zellen vor IR-Schäden schützen soll (40). In dieser Arbeit konnte aber demonstriert werden, dass die IRF4-Defizienz bereits 24 Stunden postoperativ mit erheblich verstärkter Entzündungsreaktion, Gewebeschäden und Nierenfunktionsverlust assoziiert ist. Die Störung in der B-Zell-Entwicklung, die durch IRF4-Defizienz hervorgeht, scheint in dieser Phase also keine wesentliche protektive Rolle zu spielen. In Depletionsversuchen konnte man erkennen, dass Lymphozyten insgesamt keine bedeutende Funktion in der Pathophysiologie der frühen Phase des ANV aufweisen (93). Lediglich einzelne Subtypen scheinen die späte Heilungsphase positiv zu beeinflussen (92). Wie bei der Entwicklung der Lymphozyten sind auch in der DC-Entwicklung sowohl IRF4 als auch IRF8 beteiligt. Während IRF4 für die Entwicklung von (CD4+) DCs nötig ist, reguliert IRF8 die Entwicklung von CD8 und plasmazytoide DCs. Demensprechend fehlen in IRF4-/- Mäusen (CD4+) DCs komplett (59, 74). Das Fehlen dieser Subpopulation scheint aber auf das Ergebnis keinen besonders großen Einfluss zu haben. In der Niere sind DCs die zahlenstärkste Immunzellpopulation und die stärksten Produzenten proinflammatorischer Mediatoren in der frühen Entzündungsreaktion nach IR (47). Trotz Fehlen dieser DC-Population sezernieren intrarenale DCs mehr Zytokine/Chemokine in IRF4-/- Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abbildung 36).

Perspektive

In dieser Arbeit wurde nicht nur ein Aspekt der Pathophysiologie des ANV erforscht, sondern auch grundlegende Funktionsweisen des Immunsystems beleuchtet. Ein sehr interessanter Bereich ist die sterile Entzündungsreaktion, die die Forschung noch nicht so lange beschäftigt wie die mikrobielle Infektion. Es ist bekannt, dass endogene Faktoren (DAMPs) ähnlich wie exogene Erreger Entzündungen auslösen können. Interessanterweise werden DAMPs z.T. über die gleichen Rezeptoren detektiert wie mikrobielle Bestandteile (26). Ist die anschließende Signalkaskade identisch? Wie ist es überhaupt möglich, dass durch Nekrose freiwerdende körpereigene Strukturen als pathogen erkannt werden? Auch wir konnten einmal mehr demonstrieren, dass IR mit verstärkter Entzündungsaktivität assoziiert ist. Dabei sind TLR2 und TLR4 maßgeblich beteiligt (28-30). Wie körpereigene Zellbestandteile zur Immunaktivierung nach IR führen und die feinen Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in der Immunaktivierung durch mikrobielle Erreger und endogene Faktoren wird weiterhin Bestandteil intensiver Forschungsarbeit sein. Dies gilt auch für das komplexe System der Immunregulation. In dieser Arbeit wurde die hemmende Funktion von

IRF4 in der postischämischen Niere untersucht. Sowohl IRF4 als auch SIGIRR reduzieren die IR-bedingte Entzündungsreaktion in der Niere, indem sie starke Immunaktivität renaler DCs hemmen. Während SIGIRR konstitutiv exprimiert wird (77), wird IRF4 durch IR erst induziert, um gezielt zu regulieren. Hiermit wird deutlich, wie viele feine Abstufungen die Immunregulation besitzt, um optimal funktionieren zu können. Ein weiterer Mechanismus der Feinregulation des Immunsystems wird z.B. durch die zellspezifische Expression von IRF4 wahrgenommen. Während verschiedene Zelltypen in der Niere an der Entzündung beteiligt sind, hemmt IRF4 relativ spezifisch renale DCs. In Anbetracht des komplexen Netzwerks aller immunregulatorischen Faktoren und Mechanismen (Abbildung 10) ist davon auszugehen, dass weitere Regulationsmechanismen in DCs und anderen Zellen in der Niere existieren, um überschießende Immunreaktionen zu kontrollieren und somit Funktionseinbußen zu reduzieren. In der Literatur wird berichtet, dass IRF4 die proinflammatorische Funktion von IRF5 hemmt (63, 64). Wir nehmen an, dass IRF4 auf diese Weise die Aktivität der DCs reguliert. Allerdings hat IRF4 weitere hemmende Funktionen, z.B. auf die transkriptionale Funktion von IRF1. Dies bezieht sich aber auf die Hemmung von TRAIL-Genen, die in Apoptosevorgängen involviert sind (61). Über die Interaktion mit einem der Rezeptoren, TRAIL-R4 wird jedoch auch NF- κ B aktiviert (67, 68). Da von IRF1 auch eine starke proinflammatorische Funktion im Rahmen der renalen IR zugeschrieben wird (32), entsteht die Frage, ob IRF4 zusätzlich diese Funktion hemmt. Auch dies soll Bestandteil weiterer Forschungen bleiben.

Wie in knockout-Experimenten in dieser Arbeit demonstriert wurden, prädisponieren *loss-of-function*-Mutationen des IRF4-Gens zu verstärkten IR-Schäden in der Niere und wahrscheinlich auch in anderen Organen. Auch wenn sich Ergebnisse der Grundlagenforschung nicht immer direkt auf den Menschen übertragen lassen, ist doch zu vermuten, dass das IRF4-Gen ähnliche Funktionen beim Menschen aufweist. In Humanstudien wird hauptsächlich über IRF4-Überproduktion dessen Assoziation mit hämatopoetischen Malignomen berichtet. In der Literatur wird insgesamt kaum über den Funktionsverlust des IRF4-Gens diskutiert. Neben den klassischen Risikofaktoren für die Entwicklung eines ANV, sind auch individuelle immunologische Normvarianten oder konkrete Gendefekte, v.a. der Immunregulation entscheidend für die Ausprägung der Schädigung.

Kapitel 5:

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Das ANV ist trotz erheblicher Fortschritte in der Medizin immer noch ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit hoher Mortalität und Morbidität (4, 6). Die einzige wirksame Therapie ist die Nierenersatztherapie mittels Dialyse, die die Mortalität allerdings nicht ausreichend senkt (6). Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie des ANV und etwaiger prädisponierender Faktoren könnte in der Zukunft zu neuen therapeutischen Möglichkeiten verhelfen.

Die IR in der Niere führt zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit nachfolgender steriler Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung. Bei langanhaltender Ischämie kommt es zur Zellnekrose, die v.a. das Tubulussystem betrifft (4). Dabei werden intrazelluläre Bestandteile (DAMPs) freigesetzt (26), die v.a. residente DCs aktivieren, die in der unbeeinträchtigten Niere die größte Immunzellpopulation sind (47). Dong et al. konnten zeigen, dass DCs die stärksten Produzenten von TNF- und anderen proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen in der postischämischen Niere sind und somit entscheidend an der Initiierung der frühen Entzündungsreaktion beteiligt sind (47). Makrophagen sind zunächst relativ gering vertreten und infiltrieren zusammen mit Neutrophilen die Niere erst im Verlauf in großen Mengen, während die Zahl der residenten DCs nur gering zunimmt (89, 91). Auch das Tubulusepithel ist aktiv am postischämischen Entzündungsgeschehen beteiligt, indem TLRs hochreguliert und Entzündungsmediatoren sezerniert werden (23). In der Signaltransduktion im Rahmen der renalen IR sind v.a. TLR2 und TLR4 involviert, die über MyD88 proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen induzieren (28, 29). TLR2-, TLR4- und MyD88-Defizienz führt dementsprechend nach renaler IR zu reduzierten Gewebeschäden und Funktionseinbußen (84-87). Interessanterweise ist das Tubulusepithel stärker am Entzündungsgeschehen beteiligt als myeloische Zellen (28, 29). Dies steht nun im scheinbaren Gegensatz zu der Beobachtung, dass DCs die Hauptproduzenten von proinflammatorischen Mediatoren sind. Unsere Hypothese ist, dass myeloische Zellen in ihrer Entzündungsaktivität gehemmt werden. Aus dieser Überlegung heraus wurde der entzündungshemmende Faktor IRF4 im Rahmen der renalen IR untersucht. Es ist bekannt, dass IRF4 durch LPS induziert werden kann und über die kompetitive Hemmung des proinflammatorisch wirkenden Faktors IRF5 die Entzündungsaktivität reduziert (63, 64). Wir konnten zeigen, dass IRF4 nur eine geringe Basisexpression in der Niere ausweist, durch Abklemmung der Nierengefäße (in-vivo) und Stimulation mit Sauerstoffradikalen (in-vitro) aber induziert wird. Somit wurde oxidativer Stress als neuer Trigger für die IRF4-Induktion entdeckt. Allerdings steigt die IRF4-Konzentration erst 24 Stunden postoperativ signifikant an. Anscheinend wird zunächst eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, die im Verlauf durch die zeitlich verzögerte IRF4-Expression schließlich wieder begrenzt.

Die IRF4-Defizienz ist mit verstärkter Entzündung, Parenchymschäden und Funktionsverlust der Niere assoziiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass IRF4 auch in der postischämischen Niere eine entscheidende regulatorische Funktion besitzt. Durch die Isolation einzelner Zellpopulationen wurde sichtbar, dass IRF4 nur in CD45/CD11c-doppelpositiven DCs exprimiert wird und maßgeblich in diesen Zellen zur Reduktion der Immunaktivität führt. Mittels Clodronat-Liposomen wurden APCs eliminiert, deren größter Anteil in der Niere DCs ausmachen (47). Dadurch konnte der Phänotyp IRF4-defizienter Mäuse komplett aufgehoben werden. Den gleichen Effekt hatte die Blockade von TNF- mittels Etanercept. Da DCs die Hauptproduzenten von TNF- in der postischämischen Niere sind (47), lässt sich daraus schließen, dass IRF4 maßgeblich in renalen DCs entzündungshemmend wirkt, indem v.a. die TNF- -Sekretion reduziert wird.

IRF4 ist ein induzierbarer Faktor, der in der postischämischen Niere die starke Immunaktivität intrarenaler DCs hemmt, um überschießende Entzündungsreaktionen mit konsekutivem Gewebeschaden und akutem Nierenversagen zu verhindern. Loss-of-function-Mutationen des IRF4-Gens prädisponieren dementsprechend zu verstärkten IR-Schäden in der Niere und vermutlich auch in anderen Organen wie Herz, Leber oder Gehirn.

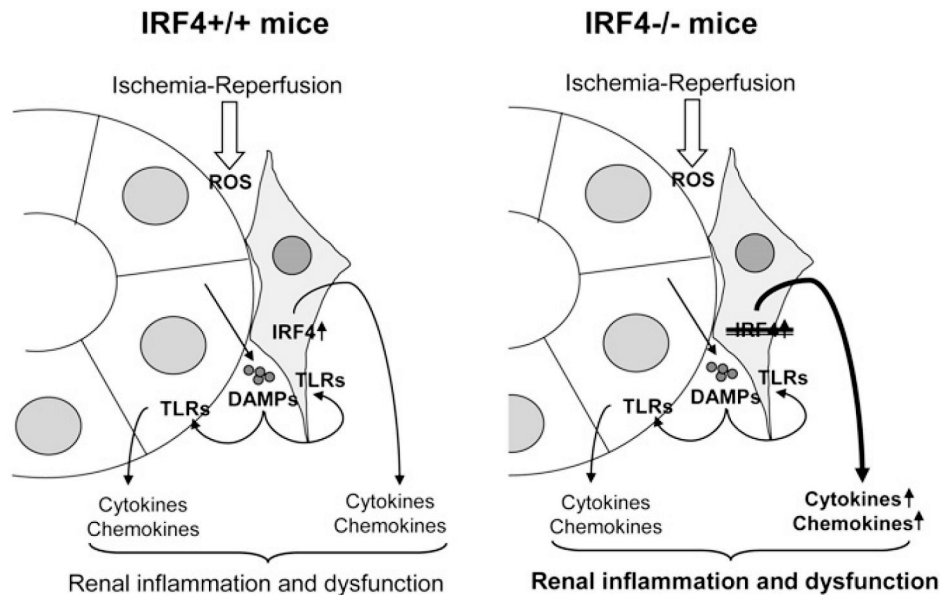


Abbildung 44: Die Rolle von IRF4 in der renalen Ischämie-Reperfusion. Ischämie führt zu Nekrose von Tubulusepithelzellen. Die anschließende Reperfusion induziert Sauerstoffradikale, die den nekrotischen Zelluntergang weiter verstärkt. Dadurch werden intrazelluläre Bestandteile (DAMPs) freigesetzt, die TLR-Signalkaskaden aktivieren und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen führen. An der sterilen Entzündungsreaktion sind Tubulusepithelzellen, Endothelzellen und Immunzellen beteiligt. In intrarenalen DCs wird IRF4 durch den oxidativen Stress induziert und reduziert deren starke proinflammatorische Aktivität. In IRF4^{-/-} Mäusen fehlt diese entzündungshemmende Wirkung, so dass es zur verstärkten Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen kommt. Dadurch wird der Gewebeschaden aggraviert und die Nierenfunktion stärker beeinträchtigt (94).

Literaturangaben

Literaturangaben

1. Abdel-Kader K, Palevsky PM. Acute kidney injury in the elderly. *Clin Geriatr Med* 2009; **25**: 331-358.
2. Oppert M. Intensivmedizin und Notfallmedizin. Akutes Nierenversagen bei Sepsis Epidemiologie, Diagnose, Therapie. *Springer Verlag* Nov. 2009; **46**: <<http://www.springerlink.com/content/t370x186105812m186105814/>>.
3. Lassnigg A, Schmidlin D, Mouhieddine M, Bachmann LM, *et al.* Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1597-1605.
4. Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, *et al.* Harrison's Principles of Internal Medicine: Acute renal failure. *McGraw-Hill* 2008; **17**.
5. Kashyap VS, Cambria RP, Davison JK, L'Italien GJ. Renal failure after thoracoabdominal aortic surgery. *J Vasc Surg* 1997; **26**: 949-955; discussion 955-947.
6. Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, *et al.* Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 904-909.
7. Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, *et al.* Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis* 2001; **32**: 686-693.
8. Bänkler H, Fritze D, Füeßl H. Duale Reihe. Innere Medizin. Hepatorenale Syndrom. *Thieme Verlag* 2001; **Sonderausgabe**: 651-653.
9. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; **9**: 427-434.
10. Welsch U. Lehrbuch Histologie. *Urban & Fischer* 2006; **2**: 34-35.
11. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic Pathology. *SAUNDERS Elsevier* 2007; **8**: 564-566.
12. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; **334**: 1448-1460.
13. Bänkler H, Fritze D, Füeßl H. Duale Reihe. Innere Medizin. Tumorlysesyndrom. *Thieme Verlag* 2001; **Sonderausgabe**: 1398.
14. Janeway A, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. *SPEKTRUM akademischer Verlag* 2002; **5**.
15. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394-397.

16. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985; **42**: 779-789.
17. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973-983.
18. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 2007; **261**: 511-528.
19. Anders HJ. Innate pathogen recognition in the kidney: toll-like receptors, NOD-like receptors, and RIG-like helicases. *Kidney Int* 2007; **72**: 1051-1056.
20. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 535-542.
21. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 499-511.
22. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; **66**: 480-485.
23. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med* 2009; **87**: 859-864.
24. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int* 2004; **66**: 496-499.
25. Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, *et al.* Renal ischemia/reperfusion leads to macrophage-mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int* 1999; **55**: 2362-2367.
26. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 279-289.
27. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, *et al.* Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 2002; **169**: 2026-2033.
28. Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, Roelofs JJ, *et al.* Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2008; **3**: e3596.
29. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, *et al.* Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2894-2903.
30. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, *et al.* TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2007; **178**: 6252-6258.

31. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; **124**: 783-801.
32. Wang Y, John R, Chen J, Richardson JA, *et al.* IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 1544-1555.
33. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, *et al.* Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008; **118**: 1657-1668.
34. Thurman JM, Lenderink AM, Royer PA, Coleman KE, *et al.* C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion. *J Immunol* 2007; **178**: 1819-1828.
35. Thurman JM, Ljubanovic D, Royer PA, Kraus DM, *et al.* Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 2006; **116**: 357-368.
36. Thurman JM, Lucia MS, Ljubanovic D, Holers VM. Acute tubular necrosis is characterized by activation of the alternative pathway of complement. *Kidney Int* 2005; **67**: 524-530.
37. Linas SL, Shanley PF, Whittenburg D, Berger E, *et al.* Neutrophils accentuate ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 1988; **255**: F728-735.
38. Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999; **34**: 384-399.
39. Bolisetty S, Agarwal A. Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more. *Kidney Int* 2009; **75**: 674-676.
40. Burne-Taney MJ, Ascon DB, Daniels F, Racusen L, *et al.* B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 2003; **171**: 3210-3215.
41. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, *et al.* Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1283-1290.
42. Liu M, Chien CC, Grigoryev DN, Gandolfo MT, *et al.* Effect of T cells on vascular permeability in early ischemic acute kidney injury in mice. *Microvasc Res* 2009; **77**: 340-347.
43. Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, *et al.* Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 1744-1753.
44. Li L, Okusa MD. Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury. *Semin Nephrol* **30**: 268-277.
45. John R, Nelson PJ. Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 2628-2635.
46. Kruger T, Benke D, Eitner F, Lang A, *et al.* Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 613-621.

47. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, *et al.* Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2007; **71**: 619-628.
48. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, *et al.* Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney Int* 2005; **68**: 1096-1108.
49. Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 1999; **162**: 196-203.
50. Lech M, Avila-Ferrufino A, Allam R, Segerer S, *et al.* Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein. *J Immunol* 2009; **183**: 4109-4118.
51. Wang J, Hu Y, Deng WW, Sun B. Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes Infect* 2009; **11**: 321-327.
52. Lech M, Kulkarni OP, Pfeiffer S, Savarese E, *et al.* Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens. *J Exp Med* 2008; **205**: 1879-1888.
53. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, *et al.* Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; **53**: 987-992.
54. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, *et al.* Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2000; **165**: 6682-6686.
55. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, *et al.* Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 2003; **171**: 6680-6689.
56. Shibolet O, Podolsky DK. TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **292**: G1469-1473.
57. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., *et al.* IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; **110**: 191-202.
58. Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci* 2008; **99**: 467-478.
59. Paun A, Pitha PM. The IRF family, revisited. *Biochimie* 2007; **89**: 744-753.
60. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 644-658.

61. Yoshida K, Yamamoto K, Kohno T, Hironaka N, *et al.* Active repression of IFN regulatory factor-1-mediated transactivation by IFN regulatory factor-4. *Int Immunol* 2005; **17**: 1463-1471.
62. Shaffer AL, Emre NC, Romesser PB, Staudt LM. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 2954-2961.
63. Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, *et al.* Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 15989-15994.
64. Honma K, Udono H, Kohno T, Yamamoto K, *et al.* Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 16001-16006.
65. Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, *et al.* Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 2008; **118**: 545-559.
66. Honda K, Taniguchi T. Toll-like receptor signaling and IRF transcription factors. *IUBMB Life* 2006; **58**: 290-295.
67. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* 2003; **139**: 89-97.
68. Wajant H. TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam Horm* 2004; **67**: 101-132.
69. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, *et al.* The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997; **7**: 813-820.
70. Lu R. Interferon regulatory factor 4 and 8 in B-cell development. *Trends Immunol* 2008; **29**: 487-492.
71. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 2006; **7**: 773-782.
72. Brustle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, *et al.* The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007; **8**: 958-966.
73. Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 2009; **458**: 351-356.
74. Tamura T, Tailor P, Yamaoka K, Kong HJ, *et al.* IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol* 2005; **174**: 2573-2581.
75. Gualco G, Weiss LM, Bacchi CE. MUM1/IRF4: A Review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **18**: 301-310.
76. Nelson PJ. Renal ischemia-reperfusion injury: renal dendritic cells loudly sound the alarm. *Kidney Int* 2007; **71**: 604-605.

77. Lech M, Garlanda C, Mantovani A, Kirschning CJ, *et al.* Different roles of TIR8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2007; **72**: 182-192.
78. Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kundig TM, *et al.* Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 1997; **275**: 540-543.
79. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994; **174**: 83-93.
80. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; **55**: 611-622.
81. Yamada K, Miwa T, Liu J, Nangaku M, *et al.* Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59. *J Immunol* 2004; **172**: 3869-3875.
82. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
83. Bänkler H, Fritze D, Fießl H. Duale Reihe. Innere Medizin. Akutes Nierenversagen (ANV). Thieme Verlag 2001; **Sonderausgabe**: 640-657.
84. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, *et al.* Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; **109**: 784-789.
85. Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, *et al.* Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2003; **108**: 2905-2910.
86. Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, *et al.* Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; **173**: 7115-7119.
87. Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, *et al.* Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 13798-13803.
88. Sanchez-Nino MD, Benito-Martin A, Goncalves S, Sanz AB, *et al.* TNF superfamily: a growing saga of kidney injury modulators. *Mediators Inflamm* **2010**.
89. Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, *et al.* The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2008; **74**: 1526-1537.
90. Ferenbach D, Hughes J. Macrophages and dendritic cells: what is the difference? *Kidney Int* 2008; **74**: 5-7.
91. Kaissling B, Le Hir M. Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. *Kidney Int* 1994; **45**: 709-720.

92. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; **23**: 1-10.
93. Jang HR, Gandolfo MT, Ko GJ, Racusen L, *et al.* The effect of murine anti-thymocyte globulin on experimental kidney warm ischemia-reperfusion injury in mice. *Transpl Immunol* 2009; **22**: 44-54.
94. Lassen S, Lech M, Rommele C, Mittruecker HW, *et al.* Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure. *J Immunol* **185**: 1976-1983.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
ADQI	<i>Acute Dialysis Quality Initiative</i>
AKIN	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
ANV	akutes Nierenversagen
APC	<i>antigen-presenting cells</i> , Antigen-präsentierende Zelle
APS, APES	Ammoniumpersulfat
BCR	<i>B-cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serum-Albumin
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CARDIF	<i>CARD adapter inducing IFN-</i>
CCR6	Chemokin-Rezeptor 6
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary-Desoxyribonukleinsäure</i>
CMV	Zytomegalievirus
Crry	<i>complement receptor 1-related protein y</i>
CSF-1	<i>colony-stimulating factor-1</i>
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2, Interleukin-8-Rezeptor
DAMP	<i>danger/damage-associated molecular pattern</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytidin-triphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetra-(<i>acid</i>)-essigsäure
EGF	<i>epidermal-growth-factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

FBS	Fötales bovines Serum
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FPR	<i>formyl peptide receptor</i>
FPRL-1	<i>formyl peptide receptor-like receptor 1</i>
GP96	Glykoprotein-96 (HSP)
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i> (DAMP)
hpf	<i>high power field</i>
HSP	Hitze-Schock-Protein
HSV	Herpes simplex-Virus
IAD	IRF-assoziierte Domäne
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPS1	<i>IFN- γ-promoter stimulator1</i>
IR	Ischämie-Reperfusion
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
IRI	<i>ischemia-reperfusion-injury</i> , Ischämie-Reperfusions-Schaden
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
ITSS	Insulin-Transferrin-Sodium-Selenite-Supplement
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KIM-1	<i>kidney-injury-marker-1</i>
KO	<i>knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich-repeat</i> , Leucin-reiche Wiederholungen
MAPK, MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein</i> -Kinase
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signalling protein</i>
MCP 1/CCL2	monocyte chemotactic protein-1 (CC-Chemokin)
MDA	<i>melanoma-differentiation-associated-gene</i>
MDP	<i>muramyl dipeptid</i>

mg	Milligramm
MHC	<i>major-histocompatibility-complex</i>
ml	Milliliter
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NDV	<i>Newcastle-disease virus</i>
NF- B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	(<i>NOD</i>)-like Rezeptoren
nm	Nanometer
NOD	<i>nucleotide oligomerisation domain</i>
NP-40	Nonoxinol 40 (Tensid aus der Gruppe der Nonylphenoethoxylate)
NTC	<i>non-template-controll</i> , Negativkontrolle mit Wasser
NTP	(Ribo-) Nukleosidtriphosphat
PAMP	<i>pathogen-associated-molecular-pattern</i> , Musterstruktur
PAS	<i>periodic-acid Schiff</i>
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PGE-1	Prostaglandin E1
poly I:C	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern-recognition-receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
PS	Penicillin-Streptomycin
RAGE	<i>receptor of advanced glycation endproducts</i>
real-time qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RIFLE	<i>Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage renal disease</i>
RIG	<i>retinoic acid-inducible gene</i>
RLH	(<i>RIG</i>)-like Helikasen
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (= Zellkulturmedium)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Standardabweichung des Mittelwerts
sham-Operation	Schein-Operation
SIGIRR	<i>single immunoglobulin IL-1-related receptor</i>
S-Kreatinin	Serum-Kreatinin
SLE	systemischer Lupus erythematodes
ssDNA	Einzelstrang-DNA
ssRNA	Einzelstrang-RNA
T3	Trijodthyronin
TAP1	Antigen-Peptide-Transporter 1
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF-	<i>transforming growth factor</i>
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	TIR-assoziiertes Protein
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecules</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing INF</i>
TWEAK	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
U/ml, units/ml	Einheiten pro Milliliter
VISA	<i>virus-induced signalling adapter</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
WT	Wildtyp

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, in seinem Labor eine sehr interessante Doktorarbeit zu machen. Er war stets daran interessiert, das Projekt kraftvoll voranzubringen und stand täglich für Gespräche und Fragen bereit. Herr Prof. Anders gab mir die Möglichkeit, mein Projekt bei vielen Gelegenheiten vorzustellen. Vielen Dank für die starke Förderung, die weit über das wissenschaftliche Arbeiten hinaus ging.

Mein Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Maciej Lech, der mir trotz des großen Arbeitspensums stets mit Geduld zur Seite stand, Fragen beantwortete und mich in das wissenschaftliche Arbeiten einführte.

Ein ganz besonderer Dank geht an Heni Eka Susanti, die mit mir zusammen die aufwendige Mauszucht meisterte, die zu unserem Leidwesen bis zum Schluss heterozygot gehalten werden musste. Neben der nicht enden wollende Genotypisierung der Tiere half sie mir bei vielen grundlegenden Anliegen wie Puffer mischen und methodischen Handgriffen.

Gleichermaßen möchte ich mich auch recht herzlich bei Ewa Radomska, Dan Draganovic und der ganzen Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch der Ludwig-Maximilians-Universität, die mich im Rahmen des *FöFoLe*-Programms nicht nur finanziell unterstützte, sondern zur wissenschaftlichen Schulung beigetragen hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mühevoll Korrektur gelesen haben und immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten, obwohl die Thematik schwer zu verstehen war. Immer wieder wurde ich ermutigt und aufgefordert, weiter zu machen. Vielen Dank.

Ischemia Reperfusion Induces IFN Regulatory Factor 4 in Renal Dendritic Cells, which Suppresses Postischemic Inflammation and Prevents Acute Renal Failure

Saraswati Lassen,^{*,1} Maciej Lech,^{*,1} Christoph Römmele,^{*} Hans-Willi Mittrücker,^{†,‡} Tak W. Mak,[‡] and Hans-Joachim Anders^{*}

Ischemia reperfusion (IR) activates TLRs causing subsequent sterile inflammation, for example in postischemic acute renal failure. Unexpectedly, TLR signaling predominates in intrinsic renal cells and not in intrarenal APCs in the postischemic kidney. We hypothesized that certain factors suppress APC activation and thereby limit sterile renal inflammation, for example, IFN regulatory factor 4 (IRF-4), an inducible inhibitor of LPS signaling. Oxidative stress was a trigger for IRF4 induction in myeloid cells in vitro as well as in CD45⁺/CD11c⁺ cells in the postischemic kidney. Lack of IRF4 aggravated acute renal failure 24 h after renal artery clamping together with increased intrarenal expression of TNF- α , IL-6, CXCL2, and CCL2 as well as excessive tubular necrosis and peritubular neutrophil influx as compared with wild-type IR kidneys. This effect almost entirely depended on the role of IRF4 to suppress TNF- α release by intrarenal APCs because either clodronate liposome depletion of these cells or TNF- α blockade with etanercept entirely abrogated the aggravation of cytokine expression and acute renal failure in *Ir4*-deficient mice. Thus, loss-of-function mutations in the IRF4 gene predispose to IR injury because the postischemic induction of IRF4 in resident APCs like CD11c⁺ dendritic cells, suppresses them to secrete TNF- α , and thereby limits inappropriate immunopathology. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 1976–1983.

Ischemia/reperfusion (IR)-induced tissue injuries (IRIs) like stroke, myocardial infarction, limb ischemia or postischemic acute renal failure commonly cause disability requiring costly medical care. Beyond direct hypoxic cell damage, IR triggers innate immune responses, which, for example, in the kidney, contribute indirectly to tubular cell necrosis and renal failure (1). How does IR cause innate immune activation? Several studies have documented that this process involves TLRs, a group of germline-encoded pathogen-recognition receptors that are highly conserved among species from *Drosophila* to humans (2). TLRs are transmembrane receptors in outer or endosomal membranes of macrophages, dendritic cells (DCs), neutrophils, B cells, and NK cells. Several TLRs are also expressed in nonimmune cells, including TLR2 and TLR4 on renal tubular epithelial cells (3). TLR signaling involves either of the two cytoplasmic adaptor molecules MyD88 or Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- β that facilitate the activation of MAPK, NF- κ B or

IFN regulatory factor (IRF) (4). In renal infection TLR activation drives the local production of proinflammatory cytokines, chemokines, and other soluble mediators that orchestrate inflammation and host defense (5, 6). Remarkably, damaged tissues release endogenous molecules that have the potential to activate TLR2/MyD88 and TLR4/MyD88 just like microbes (7, 8). This mechanism, referred to as danger signaling, also contributes to the sterile inflammation during IRIs. For example, *Tlr4*-, *Tlr2*-, and/or *Myd88*-deficient mice are protected from renal IRIs (9–11) similar to that of the liver (12), the heart (13, 14), and the brain (15). The network of intrarenal DC is considered to significantly contribute to danger signaling in the kidney (16). However, transfer of *Tlr2*-deficient bone marrow into wild-type recipient mice did not affect the extent of acute renal failure, whereas *Tlr2*-deficient recipients of wild-type bone marrow were protected from acute renal failure (9, 10). Similarly, transfer of *Tlr4*-deficient bone marrow into wild-type recipient mice had only a minor affect the extent of acute renal failure, whereas *Tlr4*-deficient recipients of wild-type bone marrow were protected from acute renal failure like *Tlr4*-deficient recipients of *Tlr2*-deficient bone marrow (9, 10). Obviously, TLR2 and TLR4 signaling in intrarenal myeloid cells is less important as compared with that in parenchymal cells of the post-ischemic kidney. We speculated that certain factors suppress TLR signaling in intrarenal myeloid cells during IR. Several endogenous molecules counterbalance inappropriate TLR2 and TLR4 signaling (17). For example, single Ig/IL-1-related receptor (SIGIRR) is a member of the transmembrane TLR/IL-1R family that inhibits TLR2/MyD88 and TLR4/MyD88 signaling via its intracellular domain (18–20). The constitutive expression of SIGIRR in intrarenal DCs (21) suppresses renal DC activation during IR and thereby limits postischemic sterile inflammation and protects from acute renal failure (22, 23). We speculated that beyond such constitutively expressed inhibitors the control of IRIs may also involve inducible inhibitors of TLR signaling in renal DCs.

^{*}Medizinische Poliklinik, Universität München, München; [†]Institute for Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; and [‡]The Campbell Family Institute for Breast Cancer Research, Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Hospital, Toronto, Ontario, Canada

¹S.L. and M.L. contributed equally to this work.

Received for publication January 7, 2010. Accepted for publication June 2, 2010.

The work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants AN372/10-1 and GRK 1202 and by the Medical Faculty of the University of Munich FöFoLe program (to S.L.). Parts of this work were prepared as a doctoral thesis by S.L. at the Medical Faculty, University of Munich, Munich, Germany.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Hans-Joachim Anders, Medizinische Poliklinik, Universität München, Pettenkoferstrasse 8a, 80336 München, Germany. E-mail address: hjanders@med.uni-muenchen.de

Abbreviations used in this paper: DAMP, damage-associated molecular pattern; DC, dendritic cell; hpf, high power field; IR, ischemia reperfusion; IRF, IFN-regulatory factor; IRI, IR-induced tissue injury; ROS, reactive oxygen species; SIGIRR, single Ig/IL-1-related receptor.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

We considered *Irf4* as a candidate gene for such an inducible suppressor of postischemic innate immune activation. IRF4 is a member of the IRF transcription factor family but unlike other IRFs, IRF4 is not regulated by IFNs and its expression is restricted to immune cells (24). By contrast, IRF4 has multiple regulatory functions in adaptive immunity (24, 25). For example, IRF4 is required for the maturation of B and T cells (26), isotype switching (27), the ability of T regulatory cells to suppress Th2 responses (28), and the induction of Th17 T cells (29, 30). IRF4 also regulates innate immunity as it can suppress TLR2 and TLR4 signaling by binding to MyD88, which impairs its interaction with downstream signaling elements (31). For example, bacterial products specifically induce IRF4 in DCs of the intestinal wall, a mechanism that protects mice from experimental colitis (32). We therefore hypothesized that IR can also induce IRF4 in renal APCs that may suppress postischemic renal inflammation and acute renal failure, a hypothesis supported by our results.

Materials and Methods

Animal studies

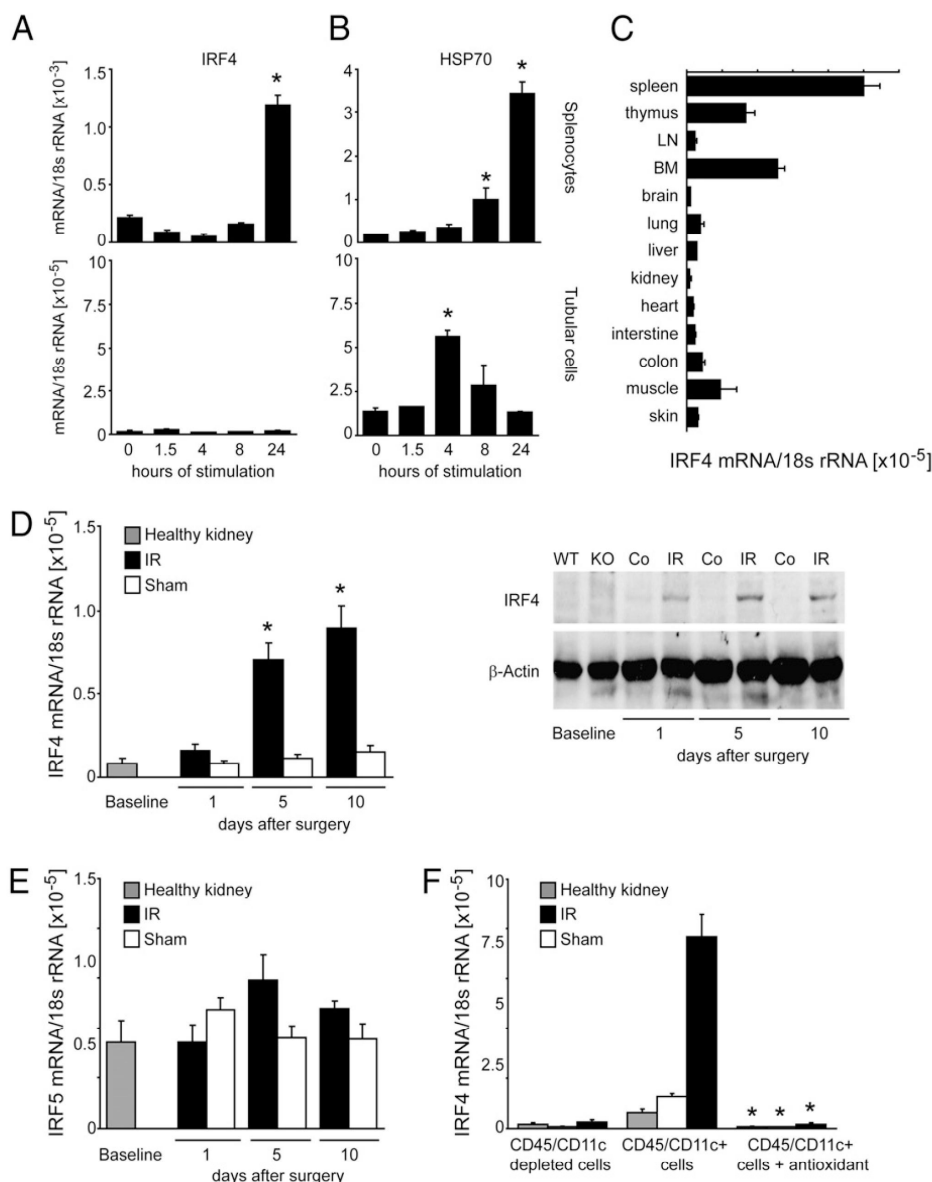
Irf4-deficient mice were generated, genotyped, and backcrossed to the C57BL/6J strain for 10 generations as previously described (26). Mice were housed in groups of five mice in filter top cages with unlimited access to food and water. Cages, nest lets, food, and water were sterilized by

autoclaving before use. All experimental procedures were approved by the local government authorities. Cl2MDP (clodronate) was a gift from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) and incorporated into liposomes as previously described (33). Baseline mRNA expression of TNF- α , IL-6, IL-12, MIP2, TGF- β , and IFN- γ was identical in wild-type and *Irf4*^{-/-} mice (data not shown). In one experiment wild-type mice were injected with 5 mg/kg of the cell-permeant superoxide-dismutase mimetic manganese (III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin (MnTMPyP, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 12 h before surgery, right after surgery, and 12 h after surgery. In other experiments wild-type mice were injected i.v. with 200 μ l clodronate- or control-liposomes on days -3 and -2 before the IR procedure as described (34). The TNF- α inhibitor etanercept (Wyeth Pharma, Madison, NJ) was given into the abdominal cavity after clamp removal at a single dose of 10 mg/kg.

Induction of renal IRIs

Groups of mice ($n = 6$) were anesthetized as described (22) before both renal pedicles or only the left renal pedicle were clamped for 30 or 45 min with a microaneurysm clamp via 1 cm flank incisions (Medicon, Tuttlingen, Germany). Body temperature was continuously measured with a rectal probe and maintained at 36°C–37°C throughout the procedure by placing the mice on a heating pad. After clamp removal, the kidney was inspected for restoration of blood flow as evidenced by returning to its original color before closing the wound with standard sutures (35). To maintain fluid balance, all mice were supplemented with 0.5 ml saline. Mice were sacrificed 1, 5, and 10 d after surgery, and pieces from IRIs and contralateral (sham) kidneys were either snap frozen in liquid nitrogen or fixed in 10% buffered formalin.

FIGURE 1. Postischemic IRF4 mRNA expression in vitro and in vivo. Spleen monocytes (A) or tubular epithelial cells (B) were exposed to 2.5 mM hypoxanthine and 0.005 U/ml xanthine oxidase and HSP70 and IRF4 mRNA expression were determined after different time points as indicated. Note that IRF4 was induced in monocytes only. Data are mean ratios of the specific mRNA version the respective 18s rRNA level \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$ versus time point zero. C, IRF4 mRNA expression was determined in murine organs of 6-wk-old male C57BL/6 mice. Total RNA was extracted from solid organs of 6-wk-old healthy C57BL/6 mice ($n = 5$). IRF4 (D) and IRF5 (E) mRNA levels were determined in postischemic or sham-operated kidneys at 1, 5, or 10 d after surgery by RT-PCR. IRF4 and IRF5 mRNA expression in untouched mice is shown as a baseline control. Data are means of IRF4 and IRF5 mRNA per respective 18s rRNA \pm SEM from five mice in each group and time point. * $p < 0.05$ versus sham control of the same time point. IRF4 expression was also shown at the protein level. F, CD45/CD11c positive DCs and CD45/CD11c negative renal cells were separated by magnetic bead selection from renal cell suspensions 5 d after IR surgery. Note that IRF4 was induced in CD45/CD11c positive cells only and this response was entirely blocked by in vivo antioxidant pretreatment. Data are means of IRF4 mRNA per respective 18s rRNA \pm SEM from five mice in each group. * $p < 0.05$ versus sham control of the same time point.



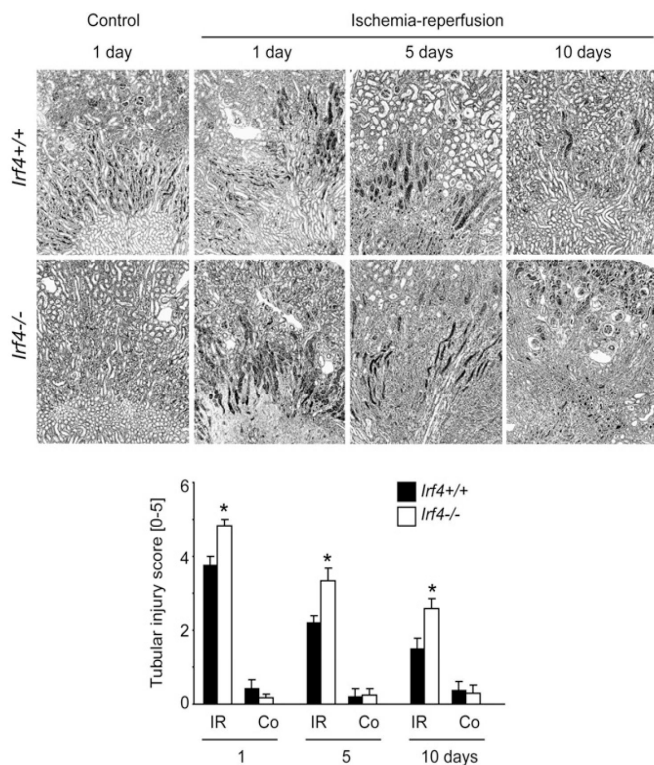


FIGURE 2. IR-triggered tubular injury. Postischemic and sham kidneys were obtained from *Irf4*-deficient and wild-type mice at various time intervals as indicated. A, Periodic acid-Schiff stains from paraffin-embedded kidneys are shown at a magnification of $\times 100$. B, Semiquantitative morphometry of tubular injury is shown as means \pm SEM from five to six mice of each group. $*p < 0.05$ versus wild-type of the respective time point.

Histological evaluation

Kidneys were embedded in paraffin and 2 μ m sections were used for periodic acid-Schiff stains and immunostaining as described (36). Postischemic tubular injury was scored by assessing the percentage of tubules in the corticomedullary junction that displayed cell necrosis, loss of brush border, cast formation, and tubular dilatation as follows: 0, none; 1, $\leq 10\%$; 2, 11–25%; 3, 26–45%; 4, 46–75%; and 5, $> 76\%$ (35). For immunostaining the following primary Abs were used: rat anti-Mac2 (Cederlane, Ontario, Canada, 1:50), rat anti-mouse neutrophils (Serotec, Oxford, U.K., 1:50). To count interstitial cells, 10 cortical high power fields (hpf) (400 \times) were analyzed. All assessments were performed by two blinded observers (S.L. and H.J.A.).

RNA preparation and real-time quantitative (TaqMan) RT-PCR

Reverse transcription and real-time RT-PCR from total renal RNA or renal cell types isolated by magnetic bead isolation was prepared as described (21). SYBR Green Dye detection system was used for quantitative real-time PCR on Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany). Gene-specific primers (300 nM, Metabion, Martinsried, Germany) were used as listed in Table I. Controls consisting of ddH₂O were negative for target and housekeeper genes.

Western blot

Western blot for IRF4 protein was performed from kidney protein extracts, which were incubated in two times loading buffer for 5 min at 95°C, resolved by 10% SDS-PAGE, and transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore, Eschborn, Germany). After blocking with 5% BSA, the filter was incubated with a rabbit polyclonal anti-IRF4 Ab (1:1000; Cell Signaling) overnight in TBS. Immune complexes were visualized using a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG Ab (1:10000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) for 1 h and processed for detection by ECL (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Germany).

In vitro studies

Spleen monocytes were isolated from C57BL/6J wild-type mice and grown on 6-well plates in 10% FCS 1% PS RPMI 1640 medium. Mouse tubular epithelial cells were seeded (5×10^5 cells/ml) in 10% FCS 1% PS DMEM medium on 6-well plates and grown overnight to subconfluence. Cells were

treated with 2.5 mM hypoxanthine (Sigma-Aldrich) and 0.005 U/ml xanthine oxidase (Sigma-Aldrich) serving as reactive oxygen species (ROS) donors. Cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 1.5–24 h, collected, and the RNA was isolated with PureLink RNA mini kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). IRF4 and HSP70 mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Data from wild-type and *Irf4*-deficient mice were compared with ANOVA on ranks, followed by the Student–Newman–Keuls test using SigmaStat Software (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Student *t* test was used for direct comparisons between wild-type and *Irf4*-deficient cells/mice. A *p* value < 0.05 indicated statistical significance.

Results

Renal IR induces IRF4 in renal CD45⁺/CD11c⁺ cells

We first studied whether oxidative stress is a trigger for IRF4 induction by exposing C57BL/6 mouse monocytes and tubular epithelial cells to a mixture of hypoxanthine and xanthine oxidase, which served as a ROS donor. Monocytes significantly induced IRF4 and HSP70 mRNA (Fig. 1A), whereas tubular epithelial cells induced HSP70 but not IRF4 (Fig. 1B). Thus, oxidative stress is a previously unknown trigger for IRF4 expression in monocytes. An IRF4 mRNA expression screen in solid organs of healthy adult C57BL/6 mice revealed low IRF4 mRNA expression levels in kidney as compared with the high levels in spleen, thymus, and bone marrow (Fig. 1C). Therefore, we next determined whether IRF4 and IRF5 are induced during renal IRIs by measuring IRF4 and IRF5 mRNA levels in IRIs and sham kidneys by real-time PCR. Groups of C57BL/6 mice underwent unilateral clamping of the renal artery for 45 min, and both kidneys were harvested at 1, 5, and 10 d after surgery. Surgery itself did not significantly induce IRF4 or IRF5 mRNA levels in sham kidneys over time, whereas IRF4 (but not IRF5) mRNA levels were significantly elevated from day 5 compared with baseline (Fig. 1D, 1E). IRF4 mRNA mainly originated from intrarenal CD45⁺/CD11c⁺ cells when we compared IRF4 mRNA expression of CD45/CD11c-depleted with CD45⁺/CD11c⁺ cell isolates from postischemic kidneys 24 h after reperfusion (Fig. 1F). Pretreating mice with the superoxide dismutase agonist and antioxidant MnTMPyP entirely blunted the postischemic IRF4 induction in renal CD45⁺/CD11c⁺ cells (Fig. 1F). Therefore, we conclude that mouse kidneys express low levels of IRF4 but oxidative stress induces IRF4 expression in resident CD45⁺/CD11c⁺ cells.

Lack of IRF4 aggravates postischemic acute renal failure and renal IRIs

To determine the functional role of IRF4 induction in renal IRIs, we first induced bilateral renal IR for 30 min in wild-type and *Irf4*^{-/-} mice ($n = 5$ –6), respectively. In wild-type mice, serum creatinine levels increased from 0.4 ± 0.2 mg/dl at baseline to 1.6 ± 0.3 mg/dl within 24 h. In *Irf4*^{-/-} mice, serum creatinine levels increased from 0.4 ± 0.1 mg/dl to 2.9 ± 0.1 mg/dl ($p = 0.01$ versus wild-type). Thus, lack of IRF4 aggravates acute renal failure after bilateral renal artery clamping in mice. The impact of the IRF4 genotypes on renal excretory function correlated with the extent of renal IRI after unilateral renal artery clamping. IRF4-deficiency enhanced IRI as evidenced by the composite score of widespread tubular necrosis, loss of brush border, cast formation, and tubular dilatation at the corticomedullary junction in the IR kidney (Fig. 2). The difference of IRI between *Irf4*^{-/-} and *Irf4*^{+/+} mice was evident at day 1, 5, and 10 postsurgery. Contralateral kidneys were neither significantly affected by the surgical procedure nor by the *Irf4* genotype. Together, lack of IRF4 aggravates postischemic acute renal failure and renal IRI.

Table I. Primers used for real-time RT-PCR

Gene	Accession Number	Sequence
IRF4	NC000079.5	Forward primer: 5'-CAAAGCACAGAGTCACCTGG-3' Reverse primer: 5'-TGCAAGCTCTTTGACACACA-3'
IRF5	NM_012057	Forward primer: 5'-ATGGGGACAAACACCATCTTC-3' Reverse primer: 5'-CAGGTTGGCCTTCCACTTG-3'
CCL2/MCP-1	NM011333	Forward primer: 5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3' Reverse primer: 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
CXCL2/MIP2	NM009140	Forward primer: 5'-CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG-3' Reverse primer: 5'-TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC-3'
IL-6	NM031168	Forward primer: 5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3' Reverse primer: 5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGG-3'
TNF- α	NM011609	Forward primer: 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' Reverse primer: 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAAGT-3'
18s RNA	NR003278	Forward primer: 5'-GCAATTATTCCTCCATGAACG-3' Reverse primer: 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

IRF4 suppresses TNF- α , IL-6, CCL2/MCP-1, and CXCL2/MIP2 expression after IR

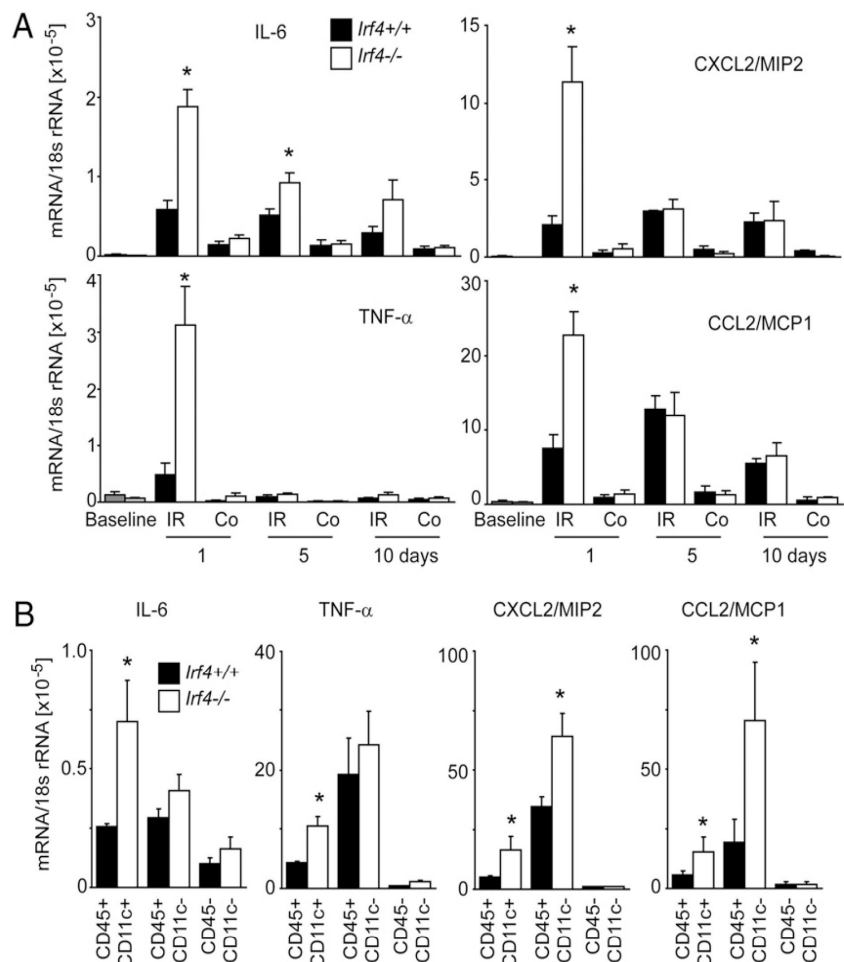
It is known that IRF4 inhibits TLR-mediated expression of proinflammatory cytokines and chemokines (31), hence, lack of IRF4 may aggravate renal IRIs via increasing local cytokine and chemokine expression. We therefore determined the renal mRNA levels of IL-6, TNF- α , CXCL2/MIP2, and CCL2/MCP-1 (Table I). Lack of IRF4 was associated with significant higher mRNA levels of all of these factors at day 1 after renal artery clamping (Fig. 3A). The increase of IL-6 and TNF- α exclusively originated from intrarenal CD45/CD11c positive DCs, whereas CXCL2/MIP2 and CCL2/MCP-1 also originated from other CD45⁺ leukocytes that had been isolated from kidneys of wild-type and *Irf4*-deficient mice 24 h after IR (Fig. 3B). However, lack of IRF4 had no effect on cytokine and chemokine expression in CD45 negative renal parenchymal cells (Fig. 3B). Thus,

IRF4 prevents postischemic acute renal failure by suppressing the early activation of intrarenal leukocytes, thereby preventing the expression of those proinflammatory cytokines and chemokines, which are known to trigger postischemic neutrophil recruitment and renal inflammation (34, 37).

Lack of IRF4 enhances interstitial neutrophil recruitment after IRIs

We suspected the increased intrarenal expression seen in *Irf4*-deficient mice would be associated with additional leukocyte influx. In fact, immunostaining documented increased neutrophil numbers at the corticomedullary junction adjacent to necrotic tubuli and in intratubular casts at 1 or 5 d after IR in *Irf4*-deficient versus wild-type mice (Fig. 4A, 4B). By contrast, the *Irf4* genotype did not affect the amount of interstitial macrophages or T cells as determined by

FIGURE 3. Renal cytokine and chemokine mRNA expression after IRI. *A*, Total RNA was extracted from ischemic (designated as IR) and contralateral (designated as Co) kidneys of IRF4-deficient (white bars) or wild-type C57BL/6 mice (black bars) at different time intervals after IR as indicated. *B*, Renal cell suspensions from mice of both genotypes 24 h after surgery underwent magnetic bead isolation to separate CD45/CD11c double positive renal DCs, CD45⁺/CD11c[−] renal leukocytes, and CD45 negative intrinsic renal cells. In *A* and *B*, mRNA expression levels were determined for the indicated cytokines and chemokines by real-time RT-PCR. Data are expressed as mean of the ratio versus the respective 18s rRNA level \pm SEM. * p < 0.05 versus wild-type.



the F4/80 positive interstitial area or by counting CD3 positive cells, respectively (Fig. 4B). Together, IRF4 suppresses postischemic acute renal failure and IRI in association with a lower influx of neutrophils early after IR.

*Clodronate liposomes abrogate the IRI aggravation in *Irf4*-deficient mice*

As we found TNF- α to be much induced in postischemic kidneys of *Irf4*-deficient mice and because intrarenal resident DCs had been reported to be the major source of TNF- α in postischemic kidneys (34), we speculated a dominant role of IRF4 to suppress TNF- α release in these cells. To address this question, we used i.p. injections of clodronate liposomes, a standard procedure to deplete intrarenal APCs (34). Clodronate injected 2 and 3 d before bilateral IR entirely prevented the aggravation of acute renal failure in *Irf4*-deficient mice (Fig. 5A). Clodronate also prevented the intrarenal induction of TNF- α , IL-6, CXCL2/MIP2, and CCL2/MCP-1 mRNA expression in *Irf4*-deficient mice (Fig. 5B). Together, renal IR specifically induces IRF4 in resident CD45⁺/CD11c⁺ cells, which suppresses their potential to massively induce TNF- α and other proinflammatory mediators of postischemic renal inflammation and acute renal failure.

*The aggravation of postischemic renal failure in *Irf4*-deficient mice is mediated by TNF- α*

Is the enhanced renal cytokine expression in *Irf4*-deficient mice causative for IRI and acute renal failure? To answer this question we blocked the biological effects of IR-induced TNF- α by a single dose of the functional TNF- α antagonist etanercept in both wild-type and *Irf4*-deficient mice. Etanercept, given directly after reperfusion completely abrogated the effect of the *Irf4* genotype on serum

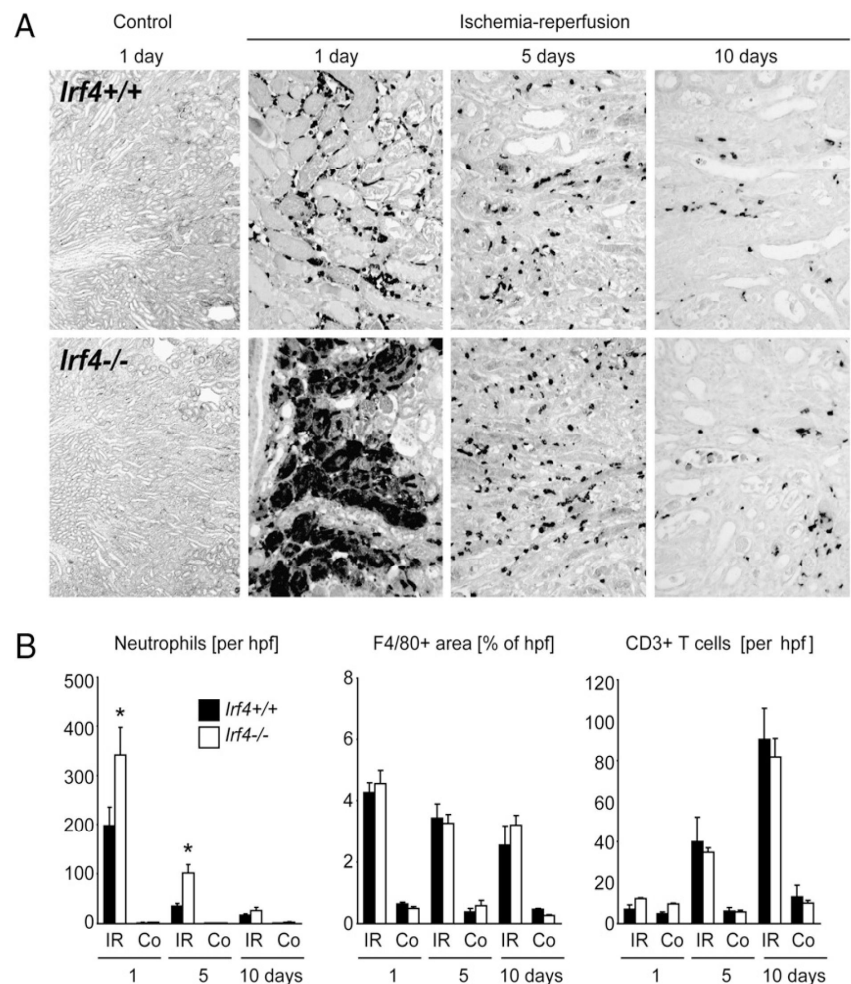
creatinine levels at 24 h after IR (Fig. 5A). Etanercept also prevented the induction of TNF- α , IL-6, CXCL2/MIP2, and CCL2/MCP-1 mRNA expression in *Irf4*-deficient mice (Fig. 5B). Thus, unblocking of TNF- α induction in intrarenal CD45⁺/CD11c⁺ cells is the dominant mechanism by which IRF4-deficiency aggravates acute renal failure.

Discussion

IRF4 was recently reported to suppress TLR signaling in DC by preventing the interaction of MyD88 with IRF5 (31). Because postischemic inflammation involves MyD88 signaling we hypothesized IRF4 may act as an endogenous inhibitor of postischemic DC activation and thereby limit sterile inflammation and organ failure. Our data confirm this hypothesis and illustrate that the activation of postischemic inflammation is balanced by IRF4 induction, which prevents overshooting immunopathology by suppressing the expression of proinflammatory mediators like TNF- α in resident APCs.

IRF4 is an immune cell-specific transcription factor that regulates B and T cell development as well as multiple aspects of adaptive immunity (26). Previous studies have mostly focused on the role of IRF4 in driving lymphoid malignancies (25), but IRF4 also controls the maturation of DCs in other settings (31, 32, 38–40), for example, on exposure to TLR or NOD-like receptor agonists. Our data document that oxidative stress adds onto the list of triggers for IRF4 induction, which suggests IRF4 regulates the activation of resident APCs in ischemic tissues. This was evidenced by exposing monocytes to hypoxanthine and xanthine oxidase, which generate ROS and induce stress response genes like HSP70 in a controllable manner in vitro (41). IRF4 was found to be induced not before 24 h after ROS exposure in spleen monocytes,

FIGURE 4. IR-triggered renal leukocyte recruitment. Postischemic and sham kidneys were obtained from *Irf4*-deficient and wild-type mice at various time intervals as indicated. A, Representative neutrophil immunostaining from paraffin-embedded kidneys are shown at a magnification of $\times 100$. Note that lack of IRF4 was associated with additional interstitial and intratubular accumulation of neutrophils at day 1 and 5. Original magnification of control kidneys day 1 is $\times 100$, of IR kidneys from all time points $\times 400$. B, Neutrophils and CD3⁺ T cells were manually counted per hpf. F4/80 positive macrophages were quantified by digital morphometry and data are expressed as percentage of hpf. Data are means \pm SEM from five to six mice in each group. * $p < 0.05$ versus wild-type of the respective time point.



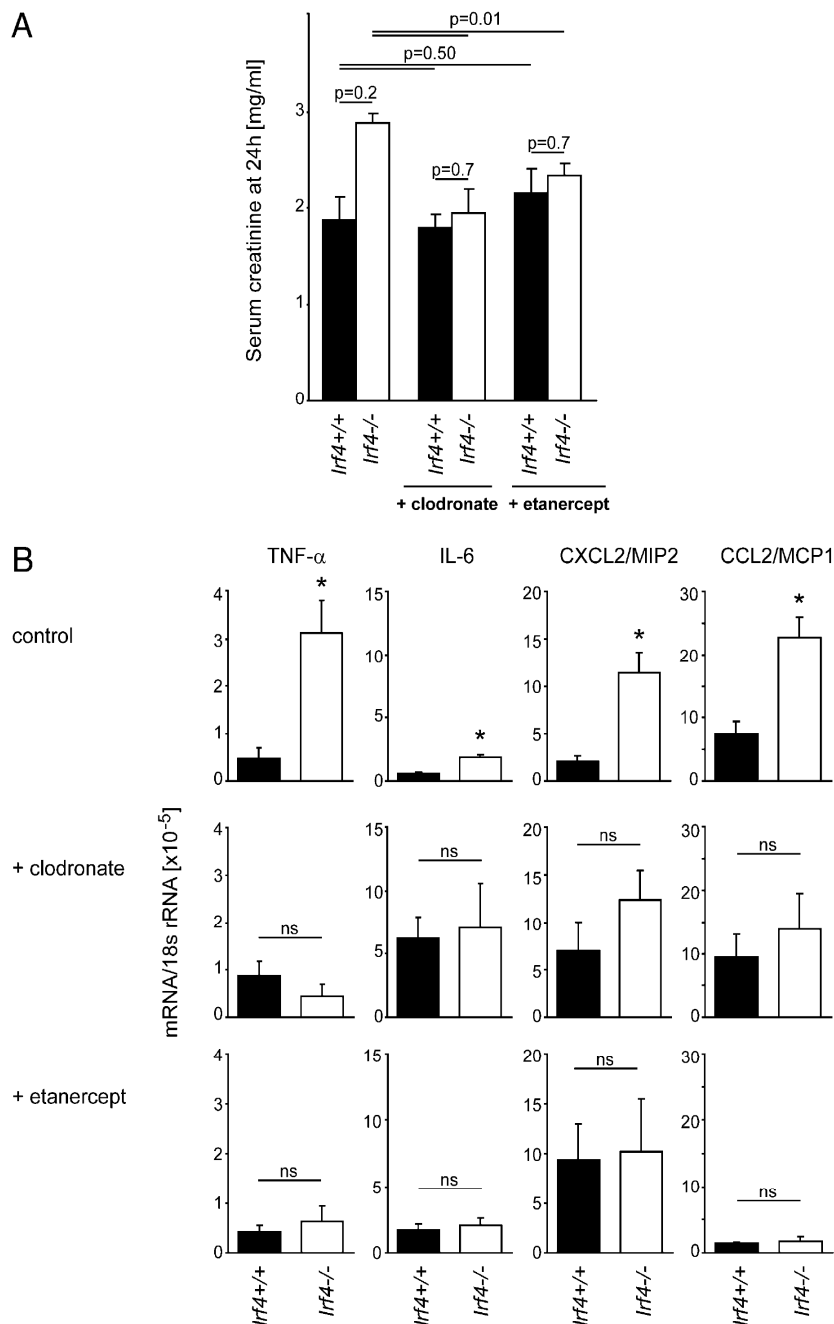


FIGURE 5. DC depletion and TNF- α blockade modulate IRI acceleration in *Irf4*-deficient mice. Wild-type and *Irf4*-deficient mice underwent bilateral IR for 45 min after having received an i.p. injection of clodronate that specifically depletes macrophages and DCs. Other groups of mice received an i.p. injection of etanercept that blocks extracellular TNF- α . **A**, Data represent mean serum creatinine levels \pm SEM of five mice in each group 24 h after bilateral IR. Note that clodronate or etanercept treatment both prevented the aggravation of acute renal failure seen in untreated *Irf4*-deficient mice. **B**, Intrarenal cytokine and chemokine expression was quantified by real-time RT-PCR. Data are expressed as mean of the ratio versus the respective 18s rRNA level \pm SEM. * $p < 0.05$ versus wild-type. Note that clodronate or etanercept treatment both prevented the induction of proinflammatory mediators in *Irf4*-deficient mice.

which was consistent with increased renal IRF4 expression 24 h after renal artery clamping, a phenomenon entirely prevented by antioxidant treatment. As such, oxidative stress does not induce IRF4 as an early response gene like IRF1, which was previously shown to respond within 15 min of oxidative stress (41). The delayed IRF4 response versus the rapid induction of IRF1 is interesting because IRF-1 promotes postischemic renal inflammation and acute renal failure (41), whereas our data documents the opposite for IRF4. Obviously, immediate induction of IRF1 fosters rapid onset of inflammation, namely, cytokine release and neutrophil influx, whereas the somewhat delayed IRF4 induction counterbalances and thereby limits the rapid postischemic immune response. As another aspect oxidative stress induces IRF4 only in myeloid cells, whereas IRF1 is also induced in tubular epithelial cells (41). Obviously, controlling the activation of resident APCs is sufficient to prevent overshooting postischemic renal inflammation. This concept is supported by the role of SIGIRR in IRI, a constitutively expressed molecule that also specifically inhibits the activation of resident DCs in the postischemic kidney (22, 23).

How does IRF4 induction suppress IRI? Renal IRI was recently reported to involve the activation of TLR2 and TLR4 (9–11, 42), potentially because dying tubular epithelial cells release intracellular molecules that can ligate TLR2 and TLR4 on adjacent cells and thereby act as so-called “damage-associated molecular patterns” (7). TLR2 and TLR4 both signal via the intracellular adaptor MyD88, as such, MyD88-deficient mice are also protected from IRI (12, 43) and postischemic acute renal failure (10, 11). IRF4 induction inhibits outside-in TLR/MyD88 signaling by binding to MyD88 and blocking the interaction sites for downstream signaling molecules (31). Therefore, *Irf4*-deficient APCs displayed enhanced NF- κ B activation and subsequent expression of proinflammatory mediators in vitro and in vivo (31, 32). Our data are consistent with this concept as lack of IRF4 was associated with increased expression of TNF- α and other NF- κ B-dependent proinflammatory mediators in postischemic kidneys. Myeloid cell-derived cytokines were responsible for IRI aggravation in *Irf4*-deficient mice as depletion of monocytic APCs with clodronate liposomes entirely abrogated this phenotype. Furthermore, TNF- α

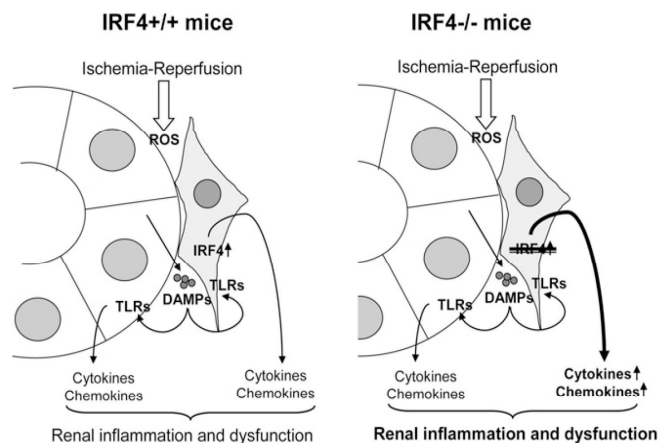


FIGURE 6. Model for the role of IRF4 in postischemic acute renal failure. *Left panel*, Ischemia reperfusion-induced ROS activate tubular epithelial cells to release DAMPs that activate TLRs signaling and the subsequent production of proinflammatory cytokines and chemokines in intrinsic renal cells (white) as well as intrarenal APCs (light gray). ROS-induced induction of IRF4 suppresses TLR signaling in APCs and thereby limits postischemic inflammation and renal dysfunction. *Right panel*, Loss-of-function mutations or deficiency of the entire IRF4 gene results in enhanced TLR signaling in APCs and thereby increases intrarenal cytokine and chemokine production. This phenomenon increases postischemic intrarenal inflammation and renal dysfunction. DAMP, damage-associated molecular pattern.

was the dominant proinflammatory mediator that accounted for disease aggravation as TNF- α blockade almost completely prevented the phenotype of *Irf4*-deficient mice. This finding is consistent with the known role of myeloid cell-derived TNF- α in renal IRIs (34, 44) and our data document that IRF4 suppresses the induction of much more TNF- α secretion in these cells.

Irf4-deficient mice display a number of baseline immune abnormalities, which potentially might affect outcomes of our experiments. IRF4 has nonredundant roles for the maturation of B and T cells (26), isotype switching (27), the ability of T regulatory cells to suppress Th2 responses (28), and the induction of Th17 T cells (29, 30). The immunoregulatory roles were shown to impair adaptive immune responses, for example, after immunization. Postischemic acute renal failure is largely devoid of adaptive immunity although T and B cell infiltrates have been described several days after renal pedicle clamping (45). However, depleting lymphocytes, for example, with antithymocyte globulin, does not affect outcomes in postischemic acute renal failure (46) and dedicated roles of single lymphocyte subtypes mainly regulate the healing late after renal pedicle clamping (45). By contrast, we found major phenotype differences between *Irf4*-deficient and wild-type mice already 24 h after surgery. Furthermore, if deficiencies in adaptive immunity were to affect the postischemic phenotype in *Irf4*-deficient mice these would rather have resulted in less than in exaggerated renal inflammation. We therefore do not consider this aspect to affect the interpretation of our results.

In summary, our findings allow three conclusions. First, resident CD45⁺/CD11c⁺ APCs are central regulators of sterile inflammation in the postischemic kidney and their activation needs to be counterbalanced to avoid inappropriate immunopathology (Fig. 6). Second, IRF4 is an inducible inhibitor of monocytes and DC activation by oxidative stress in vitro and in vivo. Third, our data identify loss-of-function mutations in the *Irf4* gene as a genetic risk factor for IR injuries such as postischemic acute renal failure.

Acknowledgments

We thank Heni Eka Susanti and Ewa Radomska for expert technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Bonventre, J. V., and A. Zuk. 2004. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 66: 480–485.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394–397.
- Tsuboi, N., Y. Yoshikai, S. Matsuo, T. Kikuchi, K. Iwami, Y. Nagai, O. Takeuchi, S. Akira, and T. Matsuguchi. 2002. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J. Immunol.* 169: 2026–2033.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
- Patole, P. S., S. Schubert, K. Hildinger, S. Khandoga, A. Khandoga, S. Segerer, A. Henger, M. Kretzler, M. Werner, F. Krombach, et al. 2005. Toll-like receptor-4: renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis. *Kidney Int.* 68: 2582–2587.
- Yang, C. W., C. C. Hung, M. S. Wu, Y. C. Tian, C. T. Chang, M. J. Pan, and A. Vandewalle. 2006. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leprospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int.* 69: 815–822.
- Kono, H., and K. L. Rock. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 279–289.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428–435.
- Leemans, J. C., G. Stokman, N. Claessen, K. M. Rouschop, G. J. Teske, C. J. Kirschning, S. Akira, T. van der Poll, J. J. Weening, and S. Florquin. 2005. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J. Clin. Invest.* 115: 2894–2903.
- Wu, H., G. Chen, K. R. Wyburn, J. Yin, P. Bertolino, J. M. Eris, S. I. Alexander, A. F. Sharland, and S. J. Chadban. 2007. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 117: 2847–2859.
- Shigeoka, A. A., T. D. Holscher, A. J. King, F. W. Hall, W. B. Kiosses, P. S. Tobias, N. Mackman, and D. B. McKay. 2007. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 178: 6252–6258.
- Zhai, Y., X. D. Shen, R. O'Connell, F. Gao, C. Lassman, R. W. Busuttil, G. Cheng, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2004. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J. Immunol.* 173: 7115–7119.
- Oyama, J., C. Blais, Jr., X. Liu, M. Pu, L. Kobzik, R. A. Kelly, and T. Bourcier. 2004. Reduced myocardial ischemia/reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 109: 784–789.
- Shishido, T., N. Nozaki, S. Yamaguchi, Y. Shibata, J. Nitobe, T. Miyamoto, H. Takahashi, T. Arimoto, K. Maeda, M. Yamakawa, et al. 2003. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 108: 2905–2910.
- Tang, S. C., T. V. Arumugam, X. Xu, A. Cheng, M. R. Mughal, D. G. Jo, J. D. Lathia, D. A. Siler, S. Chigurupati, X. Ouyang, et al. 2007. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 13798–13803.
- Nelson, P. J. 2007. Renal ischemia-reperfusion injury: renal dendritic cells loudly sound the alarm. *Kidney Int.* 71: 604–605.
- O'Neill, L. A. 2008. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* 29: 12–20.
- Wald, D., J. Qin, Z. Zhao, Y. Qian, M. Naramura, L. Tian, J. Towne, J. E. Sims, G. R. Stark, and X. Li. 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* 4: 920–927.
- Polentarutti, N., G. P. Rol, M. Muzio, D. Bosisio, M. Camnasio, F. Riva, C. Zoja, A. Benigni, S. Tomasoni, A. Vecchi, et al. 2003. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. *Eur. Cytokine Netw.* 14: 211–218.
- Qin, J., Y. Qian, J. Yao, C. Grace, and X. Li. 2005. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 280: 25233–25241.
- Lech, M., C. Garlanda, A. Mantovani, C. J. Kirschning, D. Schlöndorff, and H. J. Anders. 2007. Different roles of TIR8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 72: 182–192.
- Lech, M., A. Avila-Ferrufino, R. Allam, S. Segerer, A. Khandoga, F. Krombach, C. Garlanda, A. Mantovani, and H. J. Anders. 2009. Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein. *J. Immunol.* 183: 4109–4118.
- Noris, M., P. Cassis, N. Azzollini, R. Cavinato, D. Cugini, F. Casiraghi, S. Aiello, S. Solini, L. Cassis, M. Mister, et al. 2009. The Toll-IL-1R member Tir8/SIGIRR negatively regulates adaptive immunity against kidney grafts. *J. Immunol.* 183: 4249–4260.
- Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi. 2008. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 535–584.
- Shaffer, A. L., N. C. Emre, P. B. Romesser, and L. M. Staudt. 2009. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin. Cancer Res.* 15: 2954–2961.

26. Mittrücker, H. W., T. Matsuyama, A. Grossman, T. M. Kündig, J. Potter, A. Shahinian, A. Wakeham, B. Patterson, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. 1997. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275: 540–543.
27. Klein, U., S. Casola, G. Cattoretti, Q. Shen, M. Lia, T. Mo, T. Ludwig, K. Rajewsky, and R. Dalla-Favera. 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 7: 773–782.
28. Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J. M. Kim, T. T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A. Y. Rudensky. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458: 351–356.
29. Brüstle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplänter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.* 8: 958–966.
30. Huber, M., A. Brüstle, K. Reinhard, A. Guralnik, G. Walter, A. Mahiny, E. von Löw, and M. Lohoff. 2008. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 20846–20851.
31. Negishi, H., Y. Ohba, H. Yanai, A. Takaoka, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Taniguchi, and K. Honda. 2005. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 15989–15994.
32. Watanabe, T., N. Asano, P. J. Murray, K. Ozato, P. Tailor, I. J. Fuss, A. Kitani, and W. Strober. 2008. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J. Clin. Invest.* 118: 545–559.
33. Van Rooijen, N., and A. Sanders. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* 174: 83–93.
34. Dong, X., S. Swaminathan, L. A. Bachman, A. J. Croatt, K. A. Nath, and M. D. Griffin. 2007. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 71: 619–628.
35. Yamada, K., T. Miwa, J. Liu, M. Nangaku, and W. C. Song. 2004. Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59. *J. Immunol.* 172: 3869–3875.
36. Lech, M., O. P. Kulkarni, S. Pfeiffer, E. Savarese, A. Krug, C. Garlanda, A. Mantovani, and H. J. Anders. 2008. Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens. *J. Exp. Med.* 205: 1879–1888.
37. Miura, M., X. Fu, Q. W. Zhang, D. G. Remick, and R. L. Fairchild. 2001. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* 159: 2137–2145.
38. Carreras, E., S. Turner, M. B. Frank, N. Knowlton, J. Osban, M. Centola, C. G. Park, A. Simmons, J. Alberola-Ila, and S. Kovats. 2010. Estrogen receptor signaling promotes dendritic cell differentiation by increasing expression of the transcription factor IRF4. *Blood* 115: 238–246.
39. Mudter, J., L. Amoussina, M. Schenk, J. Yu, A. Brüstle, B. Weigmann, R. Atreya, S. Wirtz, C. Becker, A. Hoffman, et al. 2008. The transcription factor IFN regulatory factor-4 controls experimental colitis in mice via T cell-derived IL-6. *J. Clin. Invest.* 118: 2415–2426.
40. Lehtonen, A., V. Veckman, T. Nikula, R. Lahesmaa, L. Kinnunen, S. Matikainen, and I. Julkunen. 2005. Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 175: 6570–6579.
41. Wang, Y., R. John, J. Chen, J. A. Richardson, J. M. Shelton, M. Bennett, X. J. Zhou, G. T. Nagami, Y. Zhang, Q. Q. Wu, and C. Y. Lu. 2009. IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 1544–1555.
42. Pulsikens, W. P., G. J. Teske, L. M. Butter, J. J. Roelofs, T. van der Poll, S. Florquin, and J. C. Leemans. 2008. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS ONE* 3: e3596.
43. Feng, Y., H. Zhao, X. Xu, E. S. Buys, M. J. Raher, J. C. Bopassa, H. Thibault, M. Scherrer-Crosbie, U. Schmidt, and W. Chao. 2008. Innate immune adaptor MyD88 mediates neutrophil recruitment and myocardial injury after ischemia-reperfusion in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295: H1311–H1318.
44. Choi, D. E., J. Y. Jeong, B. J. Lim, K. R. Na, Y. T. Shin, and K. W. Lee. 2009. Pretreatment with the tumor necrosis factor- α blocker etanercept attenuated ischemia-reperfusion renal injury. *Transplant. Proc.* 41: 3590–3596.
45. Linfert, D., T. Chowdhry, and H. Rabb. 2009. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Rev. (Orlando)* 23: 1–10.
46. Jang, H. R., M. T. Gandolfo, G. J. Ko, L. Racusen, and H. Rabb. 2009. The effect of murine anti-thymocyte globulin on experimental kidney warm ischemia-reperfusion injury in mice. *Transpl. Immunol.* 22: 44–54.